

Université de Sherbrooke

**Modulation du protéome plaquettaire suivant un traitement à la lovastatine;
comparaison entre cohortes d'individus sains ou avec syndrome du X fragile.**

Par
Mathieu Fradet
Programme de Maîtrise en Biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)
en Biochimie

Sherbrooke, Québec, Canada
Décembre 2018

Membres du jury d'évaluation
Dr François Corbin, MD, PhD, FRCPC – Directeur de recherche – Département de
Biochimie
Dr Jean Dubé, MD, PhD, FRCPC – Co-directeur de recherche – Département de Biochimie
Dr Jean-Patrice Baillargeon, MD, MSc, FRCPC – Membre externe du programme –
Département de Médecine, service d'endocrinologie
Pr Xavier Roucou, PhD – Membre interne du programme – Département de Biochimie

© Mathieu Fradet, 2018

SOMMAIRE

Modulation du protéome plaquettaire suivant un traitement à la lovastatine; comparaison entre cohortes d'individus sains ou avec syndrome du X fragile.

Mathieu Fradet

Programme de Maîtrise en Biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.) en Biochimie ; Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

Mise en contexte : Le SXF est la première cause héréditaire de déficience intellectuelle. Des études suggèrent que la lovastatine permettrait de corriger des anomalies signalétiques importantes dans la maladie. Si la lovastatine a bien un potentiel thérapeutique en SXF, elle devrait pouvoir induire des changements protéomiques spécifiques chez les individus atteints du syndrome. L'objectif de ce projet est d'explorer le protéome d'individus avec le SXF ayant reçu un traitement de lovastatine et d'identifier des protéines ayant pu être modulées par le traitement reçu. **Méthode :** Des analyses protéomiques ont été effectuées sur des échantillons de plaquettes sanguines prélevés chez des individus atteints du SXF avant et après traitement à la lovastatine. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE, puis digérées sur gel et injectées dans un appareil LC-MS/MS. Dans le cadre d'une seconde étude clinique, une cohorte contrôle d'individus sains a également été recrutée afin de recevoir de la lovastatine. Des échantillons ont été prélevés chez ces individus afin d'éventuellement valider nos résultats protéomiques. **Résultats :** Nos analyses LC-MS/MS ont permis de caractériser de manière approfondie le protéome plaquettaire des individus avec SXF. Au total, 1731 protéines ont été identifiées. Des analyses ont confirmé que les individus atteints du SXF ont un protéome plaquettaire ayant globalement les mêmes caractéristiques que celui des individus sains. Les analyses LC-MS/MS ont permis d'identifier plusieurs protéines augmentées ou diminuées par le traitement à la lovastatine. Des analyses statistiques révèlent que 55 protéines semblent avoir été augmentées et que 30 protéines semblent avoir été diminuées par la lovastatine. Parmi les protéines significativement modulées, on retrouve des protéines notamment impliquées dans la signalisation, la glycolyse et le métabolisme du cholestérol. Les protéines issues d'ARNm ciblés par FMRP sont significativement surreprésentées parmi les protéines modulées que nous identifions ($p = 0,011$). **Conclusion :** Nos analyses statistiques suggèrent que la lovastatine pourrait induire des changements protéomiques importants, mais nos résultats ne permettent pas d'identifier avec certitude les protéines ayant été modulées par la lovastatine. Puisqu'un nombre important de faux positifs pourrait avoir été identifié lors de nos analyses, la spécificité de ces changements protéomiques doit être confirmée. Certains des biomarqueurs plaquettaires identifiés durant notre étude pourraient potentiellement être employés lors d'études cliniques sur le SXF. De tels biomarqueurs pourraient faciliter l'identification de médicaments capables de normaliser les processus cellulaires et les fonctions cognitives des individus atteints du SXF.

Mots clés : syndrome du X fragile; lovastatine; protéomique; spectrométrie de masse; biomarqueurs; plaquettes

SUMMARY

Modulation of platelet proteome by lovastatin; comparison between individuals with fragile X syndrome and healthy volunteers

Mathieu Fradet
Biochemistry program

Thesis presented to the Faculty of medicine and health sciences for the obtention of a master degree diploma (M.Sc.) in biochemistry, Faculty of medicine and health sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

Background: FXS is the leading cause of hereditary intellectual disability. Although no drug is currently approved to reduce the burden of this syndrome, lovastatin could possibly normalize some of the important signaling defects in FXS. If lovastatin does have a therapeutic potential in FXS, this drug should induce specific proteomic changes in FXS individuals. The objective of this project is to explore the proteome of SXF individuals treated with lovastatin, and to identify proteins modulated by this treatment. **Methods:** Proteomic analysis were carried on blood platelets samples collected from FXS individuals before and after treatment with lovastatin. Proteins were separated by SDS-PAGE and submitted to an in gel digestion before being injected on a LC-MS/MS device. In a second clinical trial, healthy volunteers also received lovastatin. Samples were obtained from these individuals to eventually validate our first proteomic results. **Results:** Our LC-MS/MS analyses allowed a vast characterization of the platelet proteome of individuals with FXS. Overall, 1731 different proteins were identified and quantified in our samples. Our results confirm that the baseline platelet proteome of individuals with FXS has the same characteristics as in healthy individuals. Mass spectrometry identified many proteins increased or decreased following the treatment with lovastatin. Statistical analyses reveal that 55 proteins were increased and 30 proteins were decreased by the treatment. Among the proteins significantly modulated by lovastatin, many are implicated in cell signaling, glycolysis and cholesterol metabolism. Proteins translated from mRNAs targeted by FMRP are significantly over-represented among the proteins modulated by the treatment ($p = 0,011$). **Conclusion:** Our statistical analyses suggest that lovastatin could induce important proteomic changes in FXS, but our results do not allow a definite identification of the proteins modulated by lovastatin. Because of a high false detection rate in our analyses, the specificity of these proteomic changes has to be confirmed. Some platelet biomarkers identified in our study could potentially be used in future clinical trials on FXS. These biomarkers could allow to identify drugs capable of normalizing the cellular processes and cognitive functioning in FXS.

Keywords : fragile X syndrome; lovastatin; proteomics; mass spectrometry; biomarkers; platelets

TABLE DES MATIÈRES

1. INTRODUCTION	1
1.1 ÉPIDÉMIOLOGIE DU SYNDROME DU X FRAGILE.....	1
1.2 PRÉSENTATION CLINIQUE DU SXF	1
1.2.1 Déficience intellectuelle.....	1
1.2.2 Autres manifestations psycho-comportementales du SXF	3
1.2.3 Comorbidités médicales et phénotype physique associés au SXF.....	5
1.3 PHYSIOPATHOLOGIE DU SXF	5
1.3.1 Étiologie génétique du syndrome et mode de transmission.....	5
1.3.2 La protéine FMRP et ses fonctions cellulaires	9
1.3.3 Le rôle de FMRP au niveau des épines dendritiques	11
1.3.4 La théorie mGluR et l'implication de la voie MAPK/ERK dans le SXF	12
1.3.5 Cascade MAPK/ERK : fonctionnement d'une potentielle cible thérapeutique..	16
1.3.6 Autres hypothèses physiopathologiques du SXF.....	17
1.4 PRISE EN CHARGE MÉDICALE DU SXF : APPROCHES ACTUELLES ET TRAITEMENTS EXPÉRIMENTAUX	19
1.4.1 Prise en charge médicale des individus avec SXF.....	19
1.4.2 Absence de traitement pharmacologique modifiant l'histoire naturelle de la maladie : résumé des essais thérapeutiques chez l'humain et importance d'identifier de nouveaux biomarqueurs	20
1.5 LA LOVASTATINE : UN TRAITEMENT PROMETTEUR DU SXF	23
1.5.1 Métabolisme du cholestérol, action de la lovastatine et rationnelle thérapeutique dans le SXF	23
1.5.2 Propriétés pharmacologiques de la lovastatine	27
1.5.3 Étude de la lovastatine chez la souris Fmr1 KO	30
1.5.4 Étude de la lovastatine chez des individus avec SXF : effets cliniques et biochimiques du traitement.....	31
1.6 LES PLAQUETTES SANGUINES : UN MODÈLE D'ÉTUDE PÉRIPHÉRIQUE DES NEURONES	32
1.6.1 Les plaquettes sanguines : fenêtre sur le fonctionnement neuronal.....	32

1.6.2 Fonction physiologique des plaquettes sanguines	33
1.6.3 Structure des plaquettes	34
1.6.4 Formation des plaquettes à partir des mégacaryocytes	36
1.6.5 Cascades signalétiques dans les plaquettes	37
1.6.6 Étude des protéines plaquettaires et spectrométrie de masse en tandem	38
1.6.7 Effet des statines sur les plaquettes	40
1.7 JUSTIFICATION, OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DU PROJET DE RECHERCHE	43

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES 45

2.1 ANALYSES PROTÉOMIQUES DES ÉCHANTILLONS D'INDIVIDUS AVEC SXF (ÉTUDE LOVAX)..... 45

2.1.1 Déroulement global de l'étude LovaX.....	45
2.1.2 Analyses protéomiques des échantillons plaquettaires de l'étude LovaX	45
2.1.3 Tests statistiques sur les protéines identifiées	47
2.1.4 Analyses Panther des protéines obtenues	47

2.2 MÉTHODOLOGIE DE L'ÉTUDE CLINIQUE LOVAC 48

2.2.1 Devis de recherche	48
2.2.2 Médicament administré : la lovastatine	48
2.2.3 Population à l'étude et échantillon.....	51
2.2.4 Recrutement	54
2.2.5 Déroulement de l'étude	55
2.2.6 Gestion des effets indésirables.....	59
2.2.7 Gestion du médicament (lovastatine).....	60
2.2.8 Variables cliniques recueillies	60
2.2.9 Analyse des données cliniques.....	62
2.2.10 Considérations éthiques	63

2.3 PRÉPARATION DE LYSATS PLAQUETTAIRES D'INDIVIDUS SAINS (ÉTUDE LOVAC)... 65

2.4 CONGÉLATION DE PLAQUETTES SANGUINES ENTIÈRES..... 65

2.4.1 Protocole de congélation de plaquettes	65
--	----

2.4.2 Protocole de vérification de l'intégrité des plaquettes sanguines après congélation	66
3. RÉSULTATS.....	67
3.1 OPTIMISATION DES TECHNIQUES LC-MS/MS	67
3.2 ANALYSE GLOBALE DU PROTÉOME PLAQUETTAIRE	69
3.2.1 Analyse globale des protéines plaquettaires	69
3.2.2 Analyses Panther des protéines plaquettaires	70
3.3 MODULATION DE L'EXPRESSION PROTÉIQUE PAR LA LOVASTATINE DANS LES ÉCHANTILLONS D'INDIVIDUS SXF	73
3.4 RÉSULTATS DE L'ÉTUDE LOVAC (INDIVIDUS SAINS RECEVANT LA LOVASTATINE)	78
3.4.1 Caractéristiques des participants de l'étude LovaC et innocuité du traitement ..	78
3.4.2 Données biochimiques recueillies durant l'étude LovaC	79
3.5 EFFICACITÉ DU PROTOCOLE DE CONGÉLATION DES PLAQUETTES	80
4. DISCUSSION	81
4.1 ANALYSE DES RÉSULTATS LC-MS/MS D'INDIVIDUS SXF	81
4.1.1 Technique d'analyse LC-MS/MS employée.....	81
4.1.2 Caractéristiques du protéome plaquettaire des individus SXF	83
4.1.3 Les plaquettes : un modèle intéressant pour l'étude du SXF.....	83
4.1.4 Comparaison quantitative fiable des protéines	84
4.1.5 La lovastatine induit des changements protéomiques possiblement importants pour les individus avec SXF	85
4.1.6 La lovastatine induit des changements protéomiques possiblement non-spécifiques.....	87
4.2 FORCES ET LIMITES DE NOTRE ÉTUDE DU PROTÉOME PLAQUETTAIRE AVANT/APRÈS TRAITEMENT CHEZ LES INDIVIDUS AVEC SXF.....	88
4.2.1 Forces de notre étude protéomique	88
4.2.2 Limites de notre étude protéomique	89
4.3 ANALYSE DES RÉSULTATS DE L'ÉTUDE LOVAC	91

4.4 FORCES ET LIMITES DE L'ÉTUDE LOVAC	93
5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	94
5.1 CONCLUSION DES TRAVAUX	94
5.2 PERSPECTIVES FUTURES.....	94
LISTE DES RÉFÉRENCES	96

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Chromosome X et localisation du gène FMR1 au locus Xq27.3.....	6
Figure 2 : Structure d'un neurone.....	10
Figure 3 : Épines dendritiques immatures chez un individu avec SXF (gauche), comparées aux dendrites normaux d'un individu sain (droite).....	12
Figure 4 : Résumé des fonctions de la protéine FMRP au sein des neurones normaux.....	13
Figure 5 : Voie de signalisation MAPK/ERK.....	16
Figure 6 : Structure chimique du cholestérol.....	24
Figure 7 : Voie de synthèse du cholestérol.....	26
Figure 8 : Représentation schématique du déroulement de l'étude LovaX.....	45
Figure 9 : Coloration au bleu de Coomassie révélant la présence de bandes très riches en protéines.....	68
Figure 10 : Nombre de protéines identifiées dans chaque échantillon avant et après traitement chez les participants de l'étude LovaX.....	69
Figure 11 : Classes de protéines (selon la notation <i>Panther</i>) représentées parmi les protéines les plus abondantes de l'échantillon 10V0.....	71
Figure 12 : Nombre de protéines impliquées dans diverses voies biochimiques, telles qu'identifiées par le logiciel <i>Panther</i>	73

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Atteinte typique associée au niveau de déficience intellectuelle chez des individus avec SXF.....	2
Tableau 2 : Résumé des différents types de mutations associées au SXF.....	8
Tableau 3 : Études ayant démontré une perturbation de l'activité de la voie MAPK/ERK dans la physiopathologie du SXF.....	14
Tableau 4 : Effets indésirables connus de la lovastatine.....	29
Tableau 5 : Effet connu des statines sur le protéome des plaquettes : résumé des études <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	40
Tableau 6 : Effet des statines sur la signalisation dans les plaquettes.....	42
Tableau 7 : Effets indésirables connus de la lovastatine.....	51
Tableau 8 : Calendrier des rencontres pour l'étude LovaC.....	55
Tableau 9 : Temps alloué aux éléments de la rencontre V0.....	56
Tableau 10 : Temps alloué aux éléments de la rencontre V1.....	58
Tableau 11 : Temps alloué aux éléments de la rencontre V2.....	59
Tableau 12 : Instruments de mesure des variables d'innocuité et d'effets de la lovastatine....	61
Tableau 13 : Données de base recueillies sur les participants de l'étude LovaC.....	62
Tableau 14 : Diminution de l'abondance de certaines protéines après excision des bandes sur le gel SDS-PAGE.....	69
Tableau 15 : Sélection de processus biologiques surreprésentés et sous-représentés selon le logiciel <i>Panther</i> parmi les protéines les plus abondantes de l'échantillon 10V0.....	72
Tableau 16 : Protéines significativement augmentées par le traitement à la lovastatine chez les individus de l'étude LovaX.....	74
Tableau 17 : Protéines significativement diminuées par le traitement à la lovastatine chez les individus de l'étude LovaX.....	76
Tableau 18 : Caractéristiques démographiques des participants de l'étude LovaC.....	78
Tableau 19 : Habitus des participants de l'étude LovaC.....	78
Tableau 20 : Modulation du bilan lipidique par la lovastatine ; comparaison entre cohorte d'individus sains (LovaC) ou avec SXF (LovaX).....	79

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2D-DIGE	<i>Two dimensional difference gel electrophoresis</i>
4EBP	<i>Eukaryotic Translation initiation factor 4E binding protein 3-2</i>
5-HT ₂	5-hydroxytryptamine
5'UTR	<i>Five prime Untranslated Transcribed Region</i>
ABAS-II	Système d'évaluation du comportement adaptatif, 2e édition
ABC-C	<i>Aberrant Behavior Checklist-Community</i>
ABC-C _{FX}	<i>Fragile X Syndrome-adapted Aberrant Behavior Checklist-Community</i>
ADP	Adénosine diphosphate
Akt	Protéine kinase B
ALT	Alanine aminotransférase
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
Apo	Apolipoprotéine
AST	Aspartate aminotransférase
ATP5A1	<i>ATP synthase subunit alpha, mitochondrial</i>
BONLAC	Approche protéomique combinant SILAC (<i>Stable isotope labeling by amino acid in cell culture</i>) et BONCAT (<i>Bioorthogonal noncanonical amino acid tagging</i>)
C-Total	Cholestérol total
CASC3	<i>Cancer Susceptibility 3</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CGI	<i>Clinical Global Impression Scale</i>
CGI-I	<i>Clinical Global Impression Scale-Improvement</i>
CHUS	Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke
CK	Créatine kinase
CoA	Coenzyme A
COX-1	Cyclo-oxygénase 1
CpG	Séquence cytosine-phosphate-guanine
CR-CHUS	Centre de recherche du Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke
CTEP	2-chloro-4-((2,5-dimethyl-1-(4-(trifluoromethoxy)phenyl)-1H-imidazol-4-yl)ethynyl)pyridine
CYP3A4	Isoforme 3A4 du cytochrome P450
<i>dfmrp</i>	Gène <i>Fragile X mental retardation protein</i> (drosophile)
DIE	Une fois par jour (<i>diebus</i>)
DMSO	Dimethyl sulfoxyde
DSM IV-TR	Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux, 4e édition révisée
DSM V	Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux, 5e édition
EDTA	Éthylène diamine tétra-acétique
EF2	<i>Eukaryotic elongation factor 2</i>
eGFR	Taux de filtration glomérulaire
eIF4E	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E</i>

eIF4G2	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2</i>
eNOS	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
EVT-2	<i>Expressive Vocabulary Test, 2e édition</i>
EXCEL (étude)	<i>Expanded Clinical Evaluation of Lovastatin</i>
FDR	<i>False detection rate</i>
FMR1	Gène <i>Fragile X mental retardation 1</i> (homo sapiens)
<i>Fmr1</i>	Gène <i>Fragile X mental retardation 1</i> (souris)
FMRP	<i>Fragile X mental retardation protein</i>
FPP	Farnésyl-pyrophosphate
FSC	Formule sanguine complète
FXPOI	<i>Fragile X-associated primary ovarian insufficiency</i>
FXTAS	<i>Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome</i>
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
GNAZ	<i>Guanine nucleotide-binding protein G(z) subunit alpha</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
GP	Glycoprotéine
GPP	Géranyl pyrophosphate
Grm5	Gène <i>Glutamate Metabotropic Receptor 5</i> (souris)
GRP78	<i>78 kDa glucose-regulated protein</i>
GTP	Guanosine triphosphate
hCG	Hormone chorionique gonadotrope
HDL	<i>High-density lipoprotein</i>
HMG	Hydroxyméthylglutaryl
IDL	<i>Intermediate-density lipoprotein</i>
IECA	Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
IL-3	Interleukine 3
IL-6	Interleukine 6
IMC	Indice de masse corporelle
IPP	Isopentényl-pyrophosphate
IRIC	Institut de recherche en immunologie et oncologie
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
IV	Intraveineux
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
Kaufman-ABC	<i>Kaufman Assessment Battery for Children</i>
KH	Domaine <i>K Homology</i>
LC	Chromatographie en phase liquide
LC-MS/MS	Chromatographie en phase liquide et spectrométrie de masse en tandem
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
LovaC (étude)	Lovastatine-Contrôles : Nom de notre étude ayant permis d'administrer la lovastatine à des individus sains
LovaX (étude)	Lovastatine-X fragile : Nom de notre étude ayant permis d'administrer la lovastatine à des individus SXF
LOX-1	<i>Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1</i>
LTD	<i>Long term depression</i>

LTP	<i>Long term potentiation</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
Md	Médiane
MEK1/2	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
mGluR	Récepteur métabotrope du glutamate
MMP	Métalloprotéase matricielle
MMP9	Métalloprotéase matricielle 9
MPEP	6-Methyl-2-(phenylethynyl)pyridine
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>
MS	Spectrométrie de masse
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
<i>m/z</i>	Ratio masse/charge
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NMDA	<i>N-methyl-D-aspartic acid</i>
NO	Oxide nitreux
p47 ^{phox}	<i>Neutrophil cytosolic factor 1</i>
Panther (logiciel)	<i>Protein ANALysis THrough Evolutionary Relationships</i>
PAR1	<i>Protease-activated receptor 1</i>
PAR4	<i>Protease-activated receptor 4</i>
PBS	Tampon phosphate salin
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PDE-4	Phosphodiesterase 4
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PECAM-1	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule 1</i>
PGE1	Prostaglandine E1
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKC	Phosphokinase C
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
PO	<i>Per os</i>
PPAR	Récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes
PRP	Plasma riche de plaquettes
RBANS	<i>Repeatable Battery for the Assessment of Neuropsychological Status</i>
RER	Réticulum endoplasmique rugueux
RGG (boîte)	Séquence d'acides aminés (20-25) contenant des répétitions Arg-Gly-Gly pouvant être intercalées de résidus aromatiques
S6K1	<i>p70 ribosomal protein S6 kinase 1</i>
SB	<i>Sample buffer</i>
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
sNOX2-dp	<i>Soluble NADPH oxidase 2-derived peptide</i>
STAU1	<i>Staufen double-stranded RNA binding protein 1</i>
STAU2	<i>Staufen double-stranded RNA binding protein 2</i>

SXF	Syndrome du X fragile
TDAH	Trouble de déficit de l'attention avec/sans hyperactivité
TG	Triglycérides
TXA2	Thromboxane A2
V0	Visite #0
V1	Visite #1
V4	Visite #4
VABS	Vineland Adaptive Behaviour Scales
VAS	Échelle visuelle analogue ; <i>Visual Analog Scale</i>
VIH	Virus d'immunodéficience humaine
VLDL	Very low density lipoprotein
vWF	Facteur de von Willebrand
WAIS	<i>Wechsler Adult Intelligence Scale</i>
WB	<i>Western Blot</i>
WISC	<i>Wechsler Intelligence Scale for Children</i>
WPPSI	Échelle d'intelligence de Wechsler pour la période préscolaire et primaire
Xq27.3	Locus 27.3 situé sur le bras long du chromosome X

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement tous ceux qui ont contribué à mes recherches et qui m'ont appuyé durant mon parcours universitaire. Sans votre aide, la réalisation de mon projet n'aurait jamais été possible.

Je remercie très sincèrement mon directeur de recherche Dr François Corbin, qui m'a offert un support indéfectible tout au long de mes travaux. Votre enthousiasme et vos connaissances ont permis à mon projet de porter fruit et m'ont insufflé une passion pour la recherche. J'adresse également mes remerciements à mon co-directeur de recherche Dr Jean Dubé, qui m'a fourni un support et des conseils essentiels. Je remercie chaleureusement Dre Artuela Çaku pour son inestimable contribution à mes travaux et sa bonne humeur contagieuse. J'adresse mes remerciements à Dr Jean-Patrice Baillargeon qui m'a suivi et épaulé à toutes les étapes de mon projet. Les professeurs Corbin, Dubé, Baillargeon et Roucou doivent également être félicités et remerciés pour leur révision du présent mémoire de maîtrise.

J'adresse mes salutations et mes remerciements à toutes les personnes ayant contribué à mes recherches. Je fais remarquer le support inestimable de David Pellerin, Pamela Bouvier et Sylvie Auger. L'aide des professeurs Alan Cohen et Robert Day s'est également révélée précieuse lors de mes recherches.

Les organismes subventionnaires de mes travaux doivent également être remerciés : les Fonds de recherche du Québec – Santé, le programme de bourses aux études supérieures de l'Université de Sherbrooke, la Fondation du grand défi Pierre Lavoie et l'Axe mère-enfant du centre de recherche du CHUS.

Enfin, je remercie chaleureusement les membres de ma famille qui m'ont aidé et écouté. Un chaleureux merci à Fannie Nadeau, mon amour, pour son support et ses encouragements.

1. INTRODUCTION

1.1 Épidémiologie du syndrome du X fragile

Il existe de nombreuses conditions pouvant provoquer un dysfonctionnement du système nerveux central et induire un trouble du développement intellectuel. Parmi celles-ci, le syndrome du X fragile (SXF) est l'une des plus fréquentes. On estime qu'au sein de notre population, ce syndrome a une prévalence d'environ 1/4000 chez les hommes et 1/8000 chez les femmes (Peprah, 2012). Cette prévalence élevée en fait la première cause héréditaire de déficience intellectuelle et d'autisme (Bear *et al.*, 2004). À titre de comparaison, le SXF serait environ 10 fois plus fréquent que les autres causes de déficience intellectuelle liées au chromosome X. Le SXF serait responsable de 3% à 6% des cas de retard intellectuel chez les garçons dont la famille présente des antécédents de déficience intellectuelle sans anomalie congénitale (Nussbaum *et al.*, 2016).

1.2 Présentation clinique du SXF

1.2.1 Déficience intellectuelle

Cliniquement, ce syndrome neurodéveloppemental se manifeste par de nombreuses perturbations au niveau de la cognition et du comportement. Bien que la sévérité du syndrome varie, les individus atteints du SXF sont généralement aux prises avec une déficience intellectuelle, manifestée par une atteinte des capacités cognitives dès la jeune enfance. Ces déficits engendrent des difficultés lors des tâches faisant recours aux fonctions mentales supérieures comme le raisonnement, la résolution de problèmes, la pensée abstraite, le jugement et l'apprentissage. Par définition, les individus atteints de déficience intellectuelle ont des capacités cognitives significativement inférieures à la moyenne. Une évaluation psychométrique est utile afin de poser un tel diagnostic : lorsque soumis à un test de quotient intellectuel ayant une moyenne de 100 et un écart-type de 15, les individus atteints de déficience intellectuelle obtiennent des résultats inférieurs à 70 ± 5 (Crocq et Guelfi, 2015). En clinique, les tests les plus souvent utilisés pour évaluer les capacités cognitives sont les échelles de Wechsler (le WPPSI, le WISC et le WAIS sont employés à différents âges), le test de Stanford-Binet et le Kaufman-ABC.

La déficience intellectuelle observée chez les individus avec SXF implique également des difficultés du fonctionnement adaptatif, manifestées par une incapacité à atteindre des standards usuels d'autonomie et de responsabilités. La déficience intellectuelle des hommes qui sont atteints du SXF est généralement d'intensité modérée à sévère (Hessl *et al.*, 2009). La présentation clinique est habituellement plus bénigne chez les femmes, de sorte qu'environ la moitié sont atteintes d'un retard intellectuel léger à modéré, tandis que la seconde moitié a une intelligence normale (Hessl *et al.*, 2009). Cette sévérité peut être déterminée par le profil de fonctionnement de l'individu dans trois domaines différents : conceptuel, social et pratique. Le tableau 1 ci-dessous, inspiré du *DSM-V*, donne des exemples d'atteinte typique pour chaque niveau de sévérité du SXF (Crocq et Guelfi, 2015). En clinique, le fonctionnement adaptatif peut notamment être étudié à l'aide de l'échelle de Vineland (*Vineland Adaptive Behavior Scale*, 2nd edition - VABS) ou de l'ABAS-II (*Adaptive Behavior Assessment System*, 2nd edition).

Tableau 1 : Atteinte typique associée au niveau de déficience intellectuelle chez des individus avec SXF.

Sévérité de la déficience intellectuelle associée au SXF	Fonctionnement conceptuel	Fonctionnement social	Fonctionnement pratique
Légère (niveau d'atteinte plus souvent observée chez les femmes)	L'apprentissage scolaire impliquant les mathématiques, la lecture et l'écriture est significativement ralenti. À l'âge adulte, la pensée et la résolution de problèmes est plus concrète que chez la plupart des individus. L'utilisation des fonctions cognitives supérieures (ex : abstraction, jugement, mémoire) est également plus laborieuse.	Le comportement social est souvent immature et la communication avec les autres est imparfaite. La régulation des émotions et les réactions peuvent être immatures. L'individu peut démontrer une certaine naïveté et risque d'être manipulé par les autres.	L'individu est capable d'accomplir seul les tâches de la vie quotidienne (ex : habillage, hygiène, alimentation, etc) et les tâches simples de la vie domestiques (ex : ménage, lavage, etc). Cependant, il peut avoir besoin d'aide pour certaines tâches quotidiennes plus complexes tels que faire l'épicerie, gérer ses finances et s'occuper d'un enfant. Ces individus sont généralement capables d'exercer des métiers ne nécessitant pas des

			habiletés conceptuelles complexes.
Modérée (niveau d'atteinte plus souvent observée chez les hommes)	L'apprentissage avant la scolarisation, puis à l'école est significativement ralenti et parfois même limité. Les individus adultes ont énormément de difficultés à utiliser des concepts académiques dans leur travail ou leur vie quotidienne.	La communication verbale est simplifiée. Leur capacité à entrer en relation est généralement préservée, mais ils peuvent avoir des difficultés à percevoir et à interpréter les signaux d'autrui. Leur jugement social est appauvri, de sorte qu'ils ont besoin d'aide pour atteindre du succès dans plusieurs tâches. Du support social est nécessaire pour qu'ils réussissent au travail.	Pour eux, l'apprentissage des tâches de la vie quotidienne (ex : l'habillage, l'alimentation, etc) est laborieux, mais ils sont généralement capables d'être autonomes à l'âge adulte. Une aide importante est nécessaire pour maintenir un travail simple et pour gérer certaines activités qui sont en lien avec celui-ci (ex : transport, gestion de l'argent, etc.). Ils sont généralement capables d'apprendre à pratiquer certains loisirs. Des comportements inadaptés tel que l'automutilation peuvent être observés.
Sévère (niveau d'atteinte plus souvent observée chez les hommes)	La capacité d'apprentissage de concepts abstraits est très limitée. La lecture est généralement impossible et l'individu ne comprend généralement pas les concepts numériques. Par exemple, les concepts de temps et de quantité ne sont pas compris. Ils ont besoin de beaucoup d'aide tout au long de leur vie.	Le langage parlé est généralement très pauvre, se limitant à des mots simples ou à des phrases très courtes. Le langage est axé principalement sur des phénomènes très concrets et actuels. Les relations avec des proches sont généralement plaisantes.	Tout au long de sa vie, l'individu a besoin d'aide pour exécuter les activités de la vie quotidienne et requiert de la supervision constante. Il ne peut pas prendre de décision pour lui-même ou pour les autres. La participation à certaines activités simples requiert un processus d'apprentissage et d'aide à long terme. Plusieurs souffrent de comportements inadaptés tel que l'automutilation.

1.2.2 Autres manifestations psycho-comportementales du SXF

En plus de causer un retard intellectuel, le SXF provoque souvent des manifestations du spectre de l'autisme. Selon les études auprès d'individus avec le syndrome, un individu sur trois atteint les critères diagnostiques de l'autisme anciennement définis dans le *DSM IV-*

TR, tandis qu'un autre tiers en présente des manifestations sans atteindre l'ensemble des critères diagnostiques (Bailey *et al.*, 2000; Harris *et al.*, 2008; Niu *et al.*, 2017; Rogers *et al.*, 2001). Plus spécifiquement, les individus avec des traits autistiques peuvent avoir des déficits au niveau de la communication et des interactions sociales, ce qui se manifeste notamment par des difficultés à suivre une conversation et à exprimer des sentiments, à interpréter et employer le langage non-verbal et une incapacité à développer et comprendre le sens des relations interpersonnelles. Les individus ayant des traits autistiques peuvent également afficher des mouvements stéréotypés et répétitifs, avoir une obsession pour la routine et l'ordre, ou démontrer des intérêts inhabituels et très restreints (Niu *et al.*, 2017). Des mouvements stéréotypés de battement des mains (*flapping*) et d'automutilation peuvent être provoqués par la frustration ou l'excitation (Gallagher et Hallahan, 2012). L'ensemble de ces manifestations peut rendre difficiles les relations avec un individu atteint de SXF et contribuer à la détresse psychologique du patient et de ses proches. De plus, il est établi que les individus avec SXF et autisme ont un quotient intellectuel plus bas et un fonctionnement adaptatif moins bon que les individus avec SXF sans traits autistiques (Bailey *et al.*, 2000).

Fréquemment, les individus atteints du SXF sont également aux prises avec d'autres comorbidités neuro-développementales. Par exemple, le trouble de déficit d'attention et d'hyperactivité (TDAH) n'est pas rare chez ces individus, bien que les symptômes qui y sont associés aient tendance à diminuer à l'âge adulte (Gallagher et Hallahan, 2012; Tsiouris et Brown, 2004). Parfois, l'impulsivité, l'inattention et l'hyperactivité peuvent se manifester par des comportements agressifs ou d'automutilation.

On observe également une forte prévalence de symptômes anxieux chez les individus atteints du SXF, ce qui peut générer chez eux une grande détresse psychologique (Budimirovic *et al.*, 2006; Freund *et al.*, 1993). L'anxiété se manifeste souvent sous forme d'isolement, de mutisme sélectif, de nervosité envahissante ou de trouble obsessionnel-compulsif. Tandis que les symptômes de TDAH sont beaucoup plus fréquents chez les jeunes patients avec SXF, l'anxiété a tendance à persister chez ceux-ci jusqu'à l'âge adulte.

Enfin, certains patients avec SXF vont présenter un trouble du sommeil (Kidd *et al.*, 2014; Kronk *et al.*, 2010) ou des symptômes dépressifs tels que l'anhédonie et la tristesse (Freund *et al.*, 1993). Évidemment, ces symptômes contribuent grandement à la souffrance de ces individus.

1.2.3 Comorbidités médicales et phénotype physique associés au SXF

Bien qu'ils aient une espérance de vie normale, les individus atteints du SXF présentent parfois des caractéristiques physiques particulières et certaines comorbidités médicales. Avant l'adolescence, ces traits phénotypiques sont subtils et non-spécifiques. Par exemple, les jeunes patients atteints du SXF peuvent avoir un périmètre crânien légèrement augmenté et un tonus musculaire diminué (McConkie-Rosell *et al.*, 2005). Ils ont parfois un palais ogival, du reflux gastro-œsophagien et une tendance à faire plus d'otites moyennes aiguës ou chroniques (Gallagher et Hallahan, 2012). Ces individus ont plus souvent les yeux pâles et souffrent parfois de strabisme (Hatton *et al.*, 1998). Ils ont souvent les pieds plats et une hyperlaxité articulaire (Hagerman *et al.*, 1984). Enfin, la prévalence du prolapsus de la valve mitrale est plus élevée parmi ces individus (Crabbe *et al.*, 1993).

Les manifestations physiques du SXF s'expriment davantage à partir de l'adolescence (Lachiewicz *et al.*, 2000). Par exemple, plusieurs de ces individus développent alors un faciès allongé, une mâchoire et un front proéminents et de grandes oreilles. À l'âge de 14 ans, 87% des hommes avec SXF présentent une macro-orchidie (volume testiculaire >25 mL) (Nussbaum *et al.*, 2016). Le phénotype physique chez les femmes atteintes du SXF est très variable et généralement plus subtil. Tout compte fait, ces manifestations physiques sont généralement subtiles et peu spécifiques. L'identification d'un tel phénotype a donc une utilité très restreinte lors des démarches diagnostiques pour détecter le SXF.

L'épilepsie est très fréquente chez les individus avec SXF. Selon les études, de 10 à 20% de ces patients présentent des crises épileptiques de types variés, le plus souvent partielles sans perte de conscience ou partielles avec perte de conscience (Berry-Kravis, 2002; Hagerman et Stafstrom, 2009). Ces crises d'épilepsie peuvent généralement être bien contrôlées à l'aide de médicaments antiépileptiques et de nombreux patients cessent d'en souffrir à partir de l'adolescence.

1.3 Physiopathologie du SXF

1.3.1 Étiologie génétique du syndrome et mode de transmission

Le SXF est un syndrome génétique transmis de manière dominante lié à l'X et causé par une mutation génétique au niveau du gène FMR1 situé dans le locus Xq27.3 (Voir

figure 1; Fu *et al.*, 1991; Verkerk *et al.*, 1991). Plus spécifiquement, on retrouve une répétition excessive du trinucléotide CGG dans la région 5'UTR de ce gène. Dans la région 5'UTR des allèles normaux de ce gène, on retrouve de 6 à 45 répétitions stables de CGG. Ainsi conformé de manière stable, le gène FMR1 peut donc être transmis inchangé à travers les générations. Un tel fonctionnement normal du gène FMR1 permet de produire la protéine FMRP dont l'utilité sera décrite de manière détaillée à la section 1.3.2.

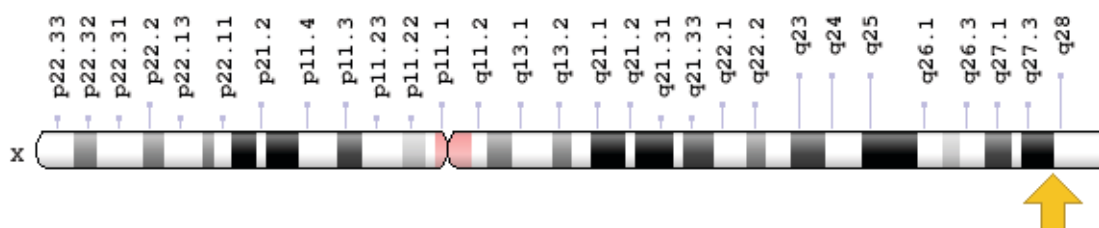


Figure 1 : Chromosome X et localisation du gène FMR1 au locus Xq27.3.¹

Chez certains individus, on retrouve une répétition excessive et instable des trinucléotides CGG au niveau du gène FMR1. Comme expliqué dans les prochains paragraphes, ces répétitions excessives de CGG peuvent causer plusieurs types différents de mutation (prémuation vs mutation complète). Qui plus est, les patients ayant la mutation complète peuvent avoir une atteinte mosaïque de répétition ou de méthylation. Le sexe de l'individu et le type de mutation génétique dont il est atteint ont un impact majeur sur la présentation clinique du syndrome (Saul et Tarleton, 2012). Le tableau 2 résume les différentes atteintes génétiques observables.

Les individus ayant entre 55 et 200 répétitions CGG à la région 5'UTR de leur gène FMR1 sont porteurs de la prémuation. Ces individus sont généralement en bonne santé et ont des capacités cognitives normales. Cependant, environ 20 à 25% des femmes porteuses de la prémuation (mais pas celles avec la mutation complète) développent une insuffisance ovarienne précoce, c'est-à-dire qu'elles débutent leur ménopause avant l'âge de 40 ans (*fragile X-associated premature ovarian insufficiency*, FXPOI) (Lisik, 2017; Milà *et al.*, 2016). Chez les plus de 50 ans, environ 40% des hommes et 16% des femmes ayant la prémuation développent un trouble neurocognitif caractérisé par un tremblement

¹ Image obtenue à l'aide du logiciel libre *Genome Decoration Page* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tools/gdp/>)

d'intention, une ataxie et une diminution des capacités cognitives (*fragile X-associated tremor/ataxia syndrome*, FXTAS) (Van Esch, 2006; Wheeler *et al.*, 2017). Certaines études ont démontré que la quantité d'ARNm de FMRP serait plus élevée dans les cellules des individus porteurs de la prémutation. Au long cours, il est plausible que les ARNm soient toxiques pour les cellules, ce qui expliquerait le développement des syndromes FXPOI et FXTAS (Hagerman et Hagerman, 2004). La prémutation ne risque pas d'être amplifiée lorsqu'elle est transmise par le père (une transmission paternelle peut même parfois raccourcir la prémutation) (Fisch *et al.*, 1995; McConkie-Rosell *et al.*, 2005). Cependant, lorsqu'une mère est porteuse de la prémutation, elle risque d'en transmettre une copie amplifiée à son enfant. Les femmes porteuses de la prémutation et n'ayant aucun trinuécléotide AGG réparti entre les CGG de leur région 5'UTR sont particulièrement à risque de transmettre une expansion de leurs CGG (Ashley-Koch *et al.*, 1998; Nolin *et al.*, 2003). À travers les générations, l'amplification des CGG peut donc générer une mutation complète responsable du SXF.

Les individus ayant plus de 200 répétitions CGG au niveau du gène FMR1 sont porteurs de la mutation complète du SXF (Maddalena *et al.*, 2001). Chez la plupart de ceux-ci, la mutation complète est associée à une méthylation complète de l'îlot CpG du gène FMR1 (Pietrobono *et al.*, 2005). Les processus menant à la méthylation du gène FMR1 sont encore mal compris, mais le résultat de ce phénomène est clair : la méthylation de FMR1 empêche la transcription du gène et la production de la protéine FMRP. Puisqu'ils ne sont porteurs que d'un seul allèle FMR1, les hommes atteints de la mutation complète ont généralement une présentation clinique plus sévère que les femmes. Tel que noté précédemment, la déficience intellectuelle est quasiment inévitable chez les hommes SXF (et généralement de degré modéré à sévère), tandis que seulement 50% des femmes SXF ont une déficience intellectuelle (généralement d'intensité légère à modérée).

Certains individus peuvent être atteints d'une mutation mosaïque d'expansion, c'est-à-dire que le nombre de répétitions CGG n'est pas identique dans toutes les cellules de leur corps (Rajan-Babu et Chong, 2016). Chez les individus atteints d'une mosaïque d'expansion, certaines cellules vont donc arborer la mutation complète (>200 CGG), tandis que d'autres cellules vont avoir la prémutation (55-200 CGG). Environ 15% des individus avec SXF sont des mosaïques d'expansion (Mandel et Biancalana, 2004). Puisqu'ils sont capables de

produire de petites quantités de FMRP, leur présentation clinique est généralement moins sévère (Rousseau *et al.*, 1994).

Certains individus peuvent être atteints d'une mutation mosaïque de méthylation, c'est-à-dire que malgré une mutation complète de FMR1 (>200 CGG), certaines de leurs cellules n'ont pas subi de méthylation de ce même gène. Chez les individus atteints d'une mosaïque de méthylation, certaines cellules vont donc arborer une méthylation de FMR1, tandis que d'autres cellules ne vont pas avoir un gène méthylé. Tout comme les femmes ou les individus mosaïques d'expansion, la présentation clinique des mosaïques de méthylation est généralement moins sévère (Pretto *et al.*, 2014).

Tableau 2 : Résumé des différents types de mutation associées au SXF

Type de mutation	Nombre de trinuécléotides CGG	Méthylation du gène FMR1	Caractéristiques clinique	
			Hommes	Femmes
Prémuation	55-200	Aucune méthylation	Cognition normale, mais risque de FXTAS. Aucun risque de transmettre une mutation amplifiée.	Cognition normale, mais risque de FXPOI et de FXTAS. À risque de transmettre une mutation amplifiée.
Mutation complète avec méthylation complète	>200	Méthylation complète	Déficience intellectuelle généralement modérée à sévère	Environ 50% avec intelligence normale et 50% avec déficience intellectuelle (généralement légère).
Mosaïque d'expansion	Variable entre les différentes lignées cellulaires. Certaines cellules ont la prémuation, d'autres ont la	Variable entre les différentes lignées. Les cellules ayant la mutation complète sont complètement méthylées, alors que les	Sévérité variable, atteinte généralement moindre.	Sévérité variable, atteinte généralement moindre.

	mutation complète.	cellules avec la prémutation ne le sont pas.		
Mosaïque de méthylation	>200	Variable, présence de cellules ayant un gène méthylé alors que d'autres n'ont pas de méthylation.	Sévérité variable, atteinte généralement moindre.	Sévérité variable, atteinte généralement moindre.

Inspiré de Saul et Tarleton (Saul et Tarleton, 2012) ; © 1993-2018 University of Washington

1.3.2 La protéine FMRP et ses fonctions cellulaires

Puisque l'absence de FMRP est responsable du SXF, il convient de s'intéresser brièvement à la structure et à la fonction de cette protéine. Le gène FMR1 contient 17 exons subissant en post-transcription un épissage alternatif et permettant de créer 12 isoformes différentes de la protéine FMRP (Brackett *et al.*, 2013). L'isoforme la plus abondante de FMRP a un poids moléculaire théorique de 71 kDa. Les différentes isoformes de cette protéine peuvent être retrouvées dans de nombreuses lignées cellulaires et dans plusieurs compartiments subcellulaires. Notamment, des études ont démontré sa présence au niveau du noyau cellulaire (Davidovic *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2009; Tamanini *et al.*, 1999) et surtout dans le cytoplasme (Devys *et al.*, 1993; Verheij *et al.*, 1993).

La région N-terminale de la protéine contient 134 acides nucléiques nécessaires à son homodimérisation et à son association avec l'ARN (Adinolfi *et al.*, 2003). Deux domaines KH sont également nécessaires pour assurer l'association entre FMRP et les ARN (Darnell *et al.*, 2005; Plante *et al.*, 2006). Enfin, une boîte RGG est nécessaire à l'union de FMRP avec des ARNm contenant une structure G-quadruplex (Darnell *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2014).

Les observations décrites ci-dessus au sujet de la structure de FMRP suggèrent que cette protéine joue un rôle important de transport et de régulation de la traduction des ARNm (Darnell *et al.*, 2005; Darnell et Klann, 2013). Tel que mentionné, FMRP peut se lier aux ARNm par plusieurs mécanismes (grâce à son domaine N-terminal, à ses boîtes KH et à sa boîte RGG). Une étude de fractionnement cellulaire a démontré que FMRP est

principalement associée à l'ARNm des polyribosomes actifs (Corbin, 1997), et les évidences démontrent que cette protéine est un important répresseur traductionnel. Après avoir été phosphorylée au niveau de sa sérine 499 par la kinase S6K1 (Narayanan *et al.*, 2008), FMRP peut inhiber la traduction des ARNm par un processus de *ribosomal stalling*, c'est-à-dire en empêchant la translocation des polyribosomes sur les brins d'ARNm (Darnell *et al.*, 2011). Bref, FMRP peut se lier à de nombreux ARNm et maintenir ceux-ci réprimés. Dans les neurones, ce phénomène est observé au niveau des corps cellulaires et des dendrites.

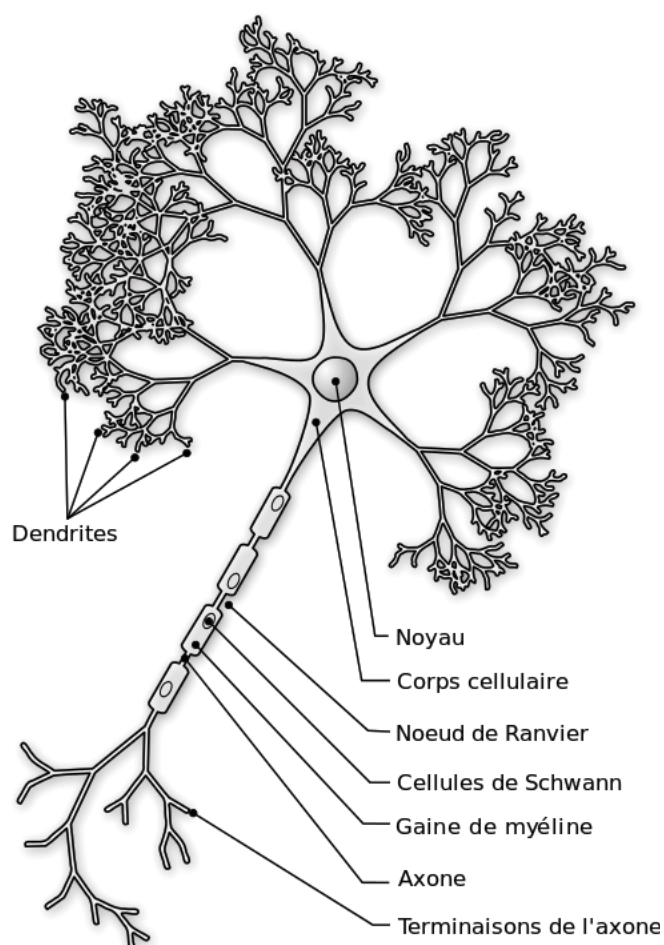


Figure 2 : Structure d'un neurone.²

² Image obtenue en ligne, usage autorisé. <https://fr.wikipedia.org/wiki/Neurone>

1.3.3 Le rôle de FMRP au niveau des épines dendritiques

Tel que mentionné ci-dessus, FMRP joue un rôle important en tant que répresseur de la traduction des ARNm. Or, dans les neurones, la traduction de protéines au niveau des dendrites est un phénomène crucial permettant de moduler l'activité des synapses et assurant du coup leur plasticité et leur bon fonctionnement (Dölen *et al.*, 2010; Steward et Schuman, 2003).

Chez les individus atteints du SXF, il n'est donc pas étonnant que l'absence de FMRP provoque des altérations significatives du fonctionnement des dendrites et des synapses. Par exemple, des études chez la souris *Fmr1* KO et des études post-mortem chez l'humain ont démontré que l'absence de FMRP entraîne la formation d'épines dendritiques d'allure immature (Irwin, 2000; Irwin *et al.*, 2001). Ces études suggèrent que l'absence de FMRP et de son inhibition dans la traduction des protéines dendritiques entraîne une production exagérée de protéines à ce niveau, et résulte en la formation d'épines dendritiques anormalement longues, fines et denses (Voir figure 3) (Bear *et al.*, 2004). Ces anomalies biochimiques et morphologiques auraient des répercussions importantes sur le fonctionnement des neurones et seraient à la base de la présentation clinique du SXF.

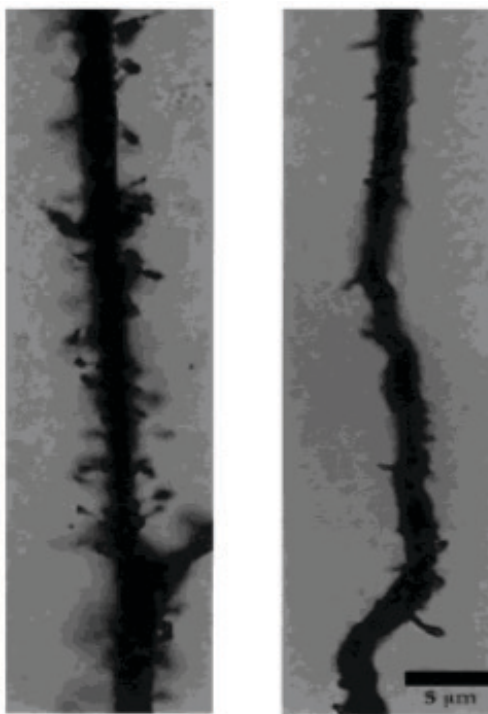


Figure 3 : Épines dendritiques immatures chez un individu avec SXF (gauche), comparées aux dendrites normaux d'un individu sain (droite) (Irwin *et al.*, 2001).³

1.3.4 La théorie mGluR et l'implication de la voie MAPK/ERK dans le SXF

Depuis plusieurs années, de nombreuses études ont permis de mieux comprendre les altérations biochimiques responsables du SXF. Des études ont notamment démontré que les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR) jouent un rôle important dans la physiopathologie de la maladie (Bear *et al.*, 2004; Dölen *et al.*, 2007).

Les récepteurs mGluR sont des récepteurs couplés aux protéines G activés par le glutamate, le principal neurotransmetteur exciteur du système nerveux central. Les récepteurs mGluR se divisent en huit sous-types (mGluR 1 à 8) pouvant être catégorisés en trois groupes (I à III) selon leur homologie séquentielle et leurs propriétés signalétiques et pharmacologiques. Les récepteurs mGluR1 et mGluR5 forment le groupe I de ces récepteurs (Conn et Pin, 1997; Masu *et al.*, 1991).

Au niveau synaptique, l'activation des récepteurs mGluR1/5 par le glutamate provoque principalement une activation de la protéine Homer et de la phosphokinase C (PKC). L'activation d'Homer active la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR, tandis que

³ Permission d'utilisation obtenue auprès de Wiley Online Library.

l'activation de la PKC active principalement la voie de signalisation MAPK/ERK (Gerber *et al.*, 2007; Niswender et Conn, 2010). Via ces interactions signalétiques, l'activation des récepteurs mGluR1/5 a pour effet d'activer des protéines favorisant la traduction des ARNm au niveau dendritique (ex : eIF4E et l'EF2) (Banko, 2006; Klann et Dever, 2004; Park *et al.*, 2008; Tavares *et al.*, 2014). Dans les neurones normaux, la protéine FMRP inhibe cette synthèse protéique par un processus de *ribosomal stalling* (tel que décrit à la section 1.3.2) et par un effet directement inhibiteur sur les voies MAPK/ERK et PI3K/Akt/mTOR (Darnell et Klann, 2013; Santoro *et al.*, 2012).

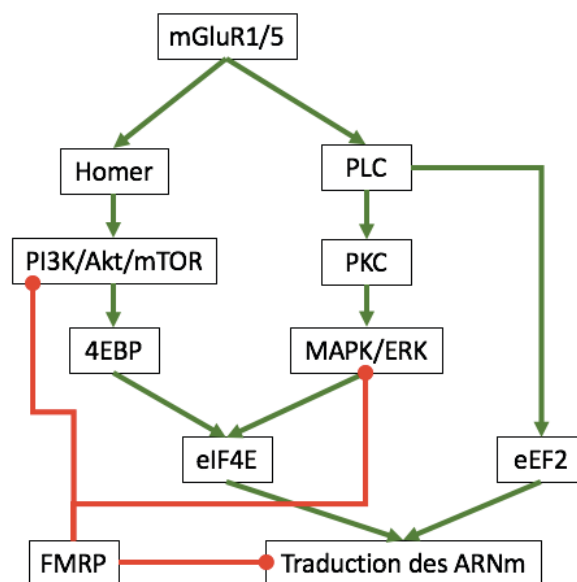


Figure 4 : Résumé des fonctions de la protéine FMRP au sein des neurones normaux. Les traits verts représentent un effet activateur tandis que les traits rouges représentent un effet inhibiteur.

En temps normal, on peut donc dire que FMRP inhibe la synthèse des protéines au niveau des dendrites, ce qui empêche l'internalisation des récepteurs glutamatergiques excitateurs AMPA au niveau synaptique. À l'inverse, chez les individus avec SXF, l'absence de FMRP entraîne une synthèse protéique exagérée en réponse à l'activation normale des récepteurs mGluR1/5. Cette synthèse exagérée de protéines entraîne une internalisation exagérée des récepteurs AMPA, ce qui résulte en une inhibition durable des synapses (une *long term depression* (LTD) excessive). Ce fonctionnement anormal des synapses serait au cœur de la physiopathologie du SXF (Bear *et al.*, 2004; Santoro *et al.*, 2012).

De nombreuses études ont démontré des anomalies signalétiques neuronales importantes en l'absence de FMRP. Notamment, de manière cohérente avec les explications physiopathologiques mentionnées ci-dessus, plusieurs équipes ont démontré une hyperactivation de la voie MAPK/ERK en l'absence de FMRP. Le tableau 3 présente un résumé des résultats expérimentaux suggérant une hyperactivité d'ERK dans la physiopathologie du SXF. Il est à noter que d'autres études chez la souris *Fmr1* KO n'ont malheureusement pas pu confirmer une hyperactivité d'ERK (Gross *et al.*, 2010; Hoeffler *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2008; Kumari *et al.*, 2014). L'étude de la phosphorylation protéique étant très délicate, il est probable que des différences méthodologiques entre les études puissent expliquer ces résultats contradictoires.

Tableau 3 : Études ayant démontré une perturbation de l'activité de la voie MAPK/ERK dans la physiopathologie du SXF

Étude	Modèle étudié	Résultats
(Hou <i>et al.</i> , 2006)	Hippocampe de souris <i>Fmr1</i> KO	Augmentation de la phosphorylation d'ERK.
(Price <i>et al.</i> , 2007)	Moelle épinière de souris <i>Fmr1</i> KO	Augmentation de la phosphorylation basale d'ERK.
(Kim <i>et al.</i> , 2008)	Souris <i>Fmr1</i> KO	Déphosphorylation rapide et persistante d'ERK après la stimulation des récepteurs mGluR du groupe 1.
(Weng <i>et al.</i> , 2008)	Souris <i>Fmr1</i> KO	Phosphorylation basale d'ERK normale, mais augmentation tardive de la phosphorylation d'ERK après stimulation des récepteurs mGluR1/5.
	Lymphocytes d'individus SXF	Phosphorylation tardive d'ERK après activation de la PKC.
(Osterweil <i>et al.</i> , 2010)	Hippocampe de souris <i>Fmr1</i> KO	Traduction protéique exagérée en réponse à l'activation d'ERK.

(Osterweil <i>et al.</i> , 2013)	Souris <i>Fmr1</i> KO	<i>In vivo</i> , l'inhibition d'ERK par la lovastatine corrige la production anormale de protéines et le phénotype des souris mutantes.
(Wang <i>et al.</i> , 2012)	Souris <i>Fmr1</i> KO	Augmentation du niveau basal d'ERK au niveau de l'hippocampe. <i>In vivo</i> , l'inhibition de la voie MAPK/ERK corrige les anomalies comportementales de la souris <i>Fmr1</i> KO.
	Neurones d'individus SXF	Hyperactivité de la voie MAPK/ERK.
(Pellerin <i>et al.</i> , 2016)	Plaquettes d'individus SXF	Hyperactivité de la voie MAPK/ERK. Cette hyperactivité peut être normalisée <i>in vivo</i> par un traitement avec la lovastatine.

L'hyperactivation de la voie MAPK/ERK en l'absence de FMRP pourrait être expliquée par deux phénomènes. Premièrement, tel que mentionné ci-dessus, la protéine FMRP aurait un effet inhibiteur direct sur la voie de signalisation MAPK/ERK, puisqu'elle empêcherait directement l'action d'ERK (Darnell et Klann, 2013). Deuxièmement, en freinant la traduction des ARNm par un processus de *ribosomal stalling*, FMRP inhiberait notamment la synthèse des protéines mGluR5 et ERK (Darnell *et al.*, 2011). Donc, en l'absence de FMRP, on observe une quantité et une activité exagérées de ces protéines. En somme, la voie de signalisation MAPK/ERK semble donc être nettement suractivée en l'absence de FMRP.

L'ensemble des observations ci-dessus s'accorde avec la théorie mGluR du SXF. De nombreuses études ont confirmé la justesse de cette théorie physiopathologique du SXF. Chez la souris *Fmr1* KO, la suppression de l'un des deux gènes mGluR5 (*Grm5* [+/-]) a permis de normaliser la synthèse protéique, l'activité synaptique et la morphologie des dendrites (Dölen *et al.*, 2007; Dölen et Bear, 2008). Cette réduction de l'activité mGluR5 a également permis de corriger certaines anomalies comportementales des souris *Fmr1* KO et les a guéris de leur tendance à subir des crises d'épilepsie. Toujours chez la souris *Fmr1* KO, l'utilisation d'inhibiteurs mGluR5 (MPEP, Mavoglurant et CTEP) a également permis de normaliser la synthèse protéique, la morphologie synaptique, la LTD et le phénotype des souris (de Vrij *et al.*, 2008; Gantois *et al.*, 2013; Kanellopoulos *et al.*, 2012; Levenga *et al.*,

2011; McBride *et al.*, 2005; Michalon *et al.*, 2012; Osterweil *et al.*, 2010; Pop *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2005).

1.3.5 Cascade MAPK/ERK : fonctionnement d'une potentielle cible thérapeutique

Tel que décrit ci-dessus, la cascade MAPK/ERK est une voie de signalisation qui semble jouer un rôle physiopathologique important dans le SXF. Située en aval des récepteurs mGluR1/5, cette cascade signalétique a notamment pour effet de recruter la protéine eIF4E, stimulant du même coup la traduction des ARNm en protéines (Banko, 2006; Klann et Dever, 2004). Dans le SXF, l'absence de FMRP provoque une hyperactivation directe de la voie MAPK/ERK et une production désinhibée de protéines au niveau dendritique.

La voie MAPK/ERK est une cascade signalétique ubiquitaire, c'est-à-dire qu'elle joue un rôle dans le bon fonctionnement d'un grand nombre de lignées cellulaires différentes (Ramos, 2008). Cette cascade signalétique est composée de plusieurs membres qui s'activent de manière successive. Le fonctionnement global de cette cascade est illustré par la figure 5. Au niveau neuronal, cette cascade peut être activée par de nombreux stimuli, tel que l'activation des récepteurs mGluR1/5 puis de la PKC. Lorsqu'activée, la PKC phosphoryle la petite GTPase Ras au niveau membranaire. Il s'en suit alors un recrutement et une activation membranaire de Raf, qui à son tour phosphoryle la protéine MEK1/2. Enfin, la kinase MEK1/2 active la protéine ERK par un processus de phosphorylation. Ultimement, cette activation d'ERK permet d'activer une panoplie de protéines tel qu'eIF4E et MYC ayant des effets majeurs sur la synthèse de protéines (Kolch, 2005; Ramos, 2008).



Figure 5 : Voie de signalisation MAPK/ERK.

Afin de fonctionner correctement, certains membres de la cascade MAPK/ERK doivent subir des modifications post-traductionnelles particulières. Notamment, pour être recrutée au niveau membranaire et pour être activée, la protéine Ras doit être suffisamment liposoluble. Cette liposolubilité est acquise par un processus de prénylation, une

modification post-traductionnelle impliquant la formation d'un lien covalent entre un lipide isoprénoïde (le farnésyl ou le géranylgéranyl qui sont des analogues du cholestérol) et la portion C-terminale de la protéine. Ainsi parée d'une molécule de farnésyl, la protéine Ras peut assumer son rôle en amont de la cascade MAPK/ERK (Zhang et Casey, 1996; Marakasova *et al.*, 2013; Novelli et D'Apice, 2012). Le recrutement de la protéine Ras s'effectue de manière préférentielle dans des zones membranaires très riches en cholestérol et en sphingolipides : les radeaux lipidiques. Ces régions membranaires facilitent la transduction du signal en aval de plusieurs récepteurs synaptiques (Wang, 2014). Le bon fonctionnement des radeaux lipidiques est notamment nécessaire à la transduction du signal des récepteurs mGluR1/5 résultant en l'activation de la cascade MAPK/ERK (Kumari *et al.*, 2013; Wang, 2014).

À la vue de ces énoncés, il apparaît que la voie de signalisation MAPK/ERK est une cible thérapeutique intéressante afin de corriger les anomalies du SXF. Puisque cette cascade semble suractivée chez les individus avec SXF et parce que cette hyperactivation semble être en partie responsable de la surproduction de protéines dans les dendrites d'individus avec SXF, une inhibition de cette voie aurait le potentiel de normaliser la signalisation neuronale, la synthèse protéique et le phénotype de ces patients. Puisque le cholestérol et ses analogues (farnésyl et géranylgéranyl) sont essentiels au recrutement de la cascade MAPK/ERK, une inhibition de la synthèse du cholestérol pourrait potentiellement être bénéfique chez les individus avec SXF. Comme nous le verrons en détail à la section 1.5, l'inhibition de l'enzyme HMG-CoA réductase à l'aide de la lovastatine permettrait d'atteindre cet effet potentiellement curatif.

1.3.6 Autres hypothèses physiopathologiques du SXF

Bien que la théorie mGluR soit largement acceptée afin d'expliquer l'étiologie du SXF, quelques autres hypothèses ont également été proposées. Une revue exhaustive de celles-ci dépasserait le cadre du présent mémoire, mais un survol des principales hypothèses alternatives est ici proposé. Il est à noter que celles-ci ne sont pas nécessairement en opposition avec la théorie mGluR. Plutôt, elles sont issues d'observations qui viennent compléter notre compréhension du SXF.

Des études ont observé que la métalloprotéinase MMP9 serait exagérément

synthétisée en l'absence de FMRP (Bilousova *et al.*, 2009; Janusz *et al.*, 2013). Grâce à sa structure particulière, MMP9 est chargée de cliver de nombreuses protéines parmi lesquelles on compte de nombreux récepteurs synaptiques, des facteurs de croissance et des protéines d'adhésion. On croit que l'activité excessive de la MMP9 serait en grande partie responsable des anomalies morphologiques dendritiques observées dans le SXF. Chez la souris *Fmr1* KO, la minocycline (une tétracycline capable d'inhiber les MMP) a démontré des résultats encourageants (Bagni et Oostra, 2013; Bilousova *et al.*, 2009).

Plusieurs études ont démontré une implication des récepteurs GABA_A et GABA_B dans le SXF. Plus précisément, le niveau d'ARNm transcrit pour certaines sous-unités des récepteurs GABA_A serait diminué, ce qui mène à une diminution de l'entrée d'anions au niveau post-synaptique et à une moindre polarisation des cellules (Curia *et al.*, 2009; El Idrissi *et al.*, 2005; Gantois *et al.*, 2006). Au niveau présynaptique, les récepteurs GABA_B auraient également une activité réduite dans le SXF (Olmos-Serrano *et al.*, 2010). Cela provoquerait un afflux exagéré de glutamate dans la fente synaptique, risquant ainsi de stimuler davantage les récepteurs mGluR1/5. Différents agonistes GABA_A (ex : l'alphaxalone, la ganaxolone et la taurine) ont montré des résultats précliniques prometteurs chez la souris *Fmr1* KO (El Idrissi *et al.*, 2010; Heulens *et al.*, 2012). L'arbaclofen, un agoniste GABA_B a également été testé avec succès chez la drosophile *dfmrp* KO et la souris *Fmr1* KO (Henderson *et al.*, 2012; Pacey *et al.*, 2009).

L'AMPc semble également impliquée dans la physiopathologie du SXF (Berry-Kravis et Ciurlionis, 1998; Berry-Kravis *et al.*, 1995). Par des mécanismes encore mal compris, l'absence de FMRP provoque chez les souris *Fmr1* KO et les drosophiles *dfmrp* KO une diminution importante de l'AMPc (Kelley *et al.*, 2008; Kelley *et al.*, 2007). La diminution de cet important second messenger diminuerait ultimement la *long-term potentiation* (LTP), ce qui contribuerait aux déficits cognitifs et comportementaux observés dans le SXF. Il est à noter que l'AMPc peut naturellement inhiber les voies MAPK/ERK et PI3K/Akt/mTOR, de sorte que son absence contribuerait à l'hyperactivité en aval des récepteurs mGluR1/5. L'implication de l'AMPc dans le SXF est appuyée par certains essais thérapeutiques chez les souris et les drosophiles mutantes. Chez la drosophile *dfmrp* KO, le MPEP (un antagoniste des mGluR1/5) a permis de normaliser l'activité de l'AMPc et de corriger des défauts morphologiques au niveau dendritique. Les souris *Fmr1* KO traitées

avec le LY431495 (un antagoniste des récepteurs mGluR des groupes II et III) ont connu une correction des niveaux d'AMPC et une normalisation de la LTD. Enfin, le rolipram (un inhibiteur sélectif de la PDE-4) a corrigé, chez la souris et chez la drosophile mutante, les anomalies de la LTD (Choi *et al.*, 2015; Choi *et al.*, 2011; Kanellopoulos *et al.*, 2012).

1.4 Prise en charge médicale du SXF : approches actuelles et traitements expérimentaux

1.4.1 Prise en charge médicale des individus avec SXF

Aujourd'hui, la prise en charge des individus avec SXF repose grandement sur une approche comportementale adaptée en fonction des besoins spécifiques et des forces de chaque individu atteint. Cette approche ne diffère globalement pas des techniques employées chez les individus souffrant d'autres causes de déficience intellectuelle. Par exemple, un programme d'éducation adaptée peut être mis à leur disposition afin de favoriser un apprentissage adapté à leurs capacités. Un environnement calme et adapté permet de réduire l'ampleur des manifestations comportementales du SXF. L'apprentissage de techniques de relaxation et l'aptitude à reconnaître les situations stressantes permettent également d'améliorer l'état des patients avec SXF (Durand et Carr, 1987; Visootsak *et al.*, 2005).

Il est important de détecter précocement et de traiter les comorbidités médicales des individus avec SXF. Notamment, tel que décrit à la section 1.2.3, environ 20% des individus avec SXF subissent des crises d'épilepsie pouvant généralement être efficacement traitées avec des antiépileptiques. Si présentes, les otites moyennes aiguës et chroniques et le reflux gastro-œsophagien doivent être pris en charge de manière standard. Aussi, les problèmes oculaires de ces individus (ex : strabisme) peuvent nécessiter une intervention. Enfin, il importe de prévenir ou de traiter les problèmes musculo-squelettiques associés à l'hyperlaxité ligamentaire (Hersh *et al.*, 2011; Kidd *et al.*, 2014; Lisik, 2017; Visootsak *et al.*, 2005).

Les comorbidités psycho-comportementales du SXF doivent être prises en charge de manière conventionnelle. Par exemple, le TDAH peut être traité à l'aide de psychostimulants, tandis que l'agitation et l'agressivité peuvent être traitées avec des mesures non-pharmacologiques ou des antipsychotiques atypiques. Une amélioration des symptômes anxieux, des symptômes obsessionnels-compulsifs et de la dépression peut être

observée avec des antidépresseurs, parmi lesquels les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine sont les plus prescrits. Enfin, les troubles du sommeil peuvent être traités par des mesures non-pharmacologiques ou des médicaments sédatifs. En somme, les patients avec SXF reçoivent souvent un nombre significatif de molécules psychoactives visant à atténuer leurs symptômes psychologiques et comportementaux (Tsiouris et Brown, 2004).

Enfin, mentionnons que des conseils génétiques peuvent être offerts aux individus porteurs de la prémutation SXF et aux parents d'un individu atteint (McConkie-Rosell *et al.*, 2005).

1.4.2 Absence de traitement pharmacologique modifiant l'histoire naturelle de la maladie : résumé des essais thérapeutiques chez l'humain et importance d'identifier de nouveaux biomarqueurs

Malheureusement, à l'heure actuelle, aucune molécule n'a été approuvée afin de corriger la physiopathologie du SXF ou de modifier l'histoire naturelle du syndrome. De nombreuses molécules ont fourni des résultats intéressants lors d'études animales précliniques (notamment chez la souris *Fmr1* KO et la drosophile *dfmrp* KO), mais la plupart d'entre elles ont montré des résultats mitigés ou décevants chez l'humain. On imagine aisément que l'accès à un tel traitement pourrait s'avérer révolutionnaire, puisqu'il permettrait de radicalement transformer la vie des individus atteints et faciliterait le quotidien de leurs proches aidants.

Les antagonistes des récepteurs mGluR5 ont fait l'objet de quelques études chez l'humain. N'ayant fait l'objet que d'une petite étude ouverte, le fenobam n'a retenu que peu d'attention (Berry-Kravis *et al.*, 2009). Pour sa part, le mavoglurant a fait l'objet de deux études randomisées placebo-contrôlées. Malheureusement, l'issue primaire de ces deux études (le score sur l'échelle ABC-C) était négative (Berry-Kravis *et al.*, 2016; Jacquemont *et al.*, 2011).

Agissant en tant qu'activateur de l'AMPC, le lithium a fait l'objet d'une petite étude ouverte (Berry-Kravis *et al.*, 2008). L'issue primaire de cette étude (la sous-échelle d'irritabilité de l'ABC-C) était négative, bien que des résultats positifs aient été observés avec d'autres échelles de mesure du comportement : ABC-C, VABS, VAS, CGI et RBANS. Évidemment, il est supposé qu'un effet placebo important ait pu affecter les résultats de cette

petite étude ouverte.

L'ampakine (CX516), une molécule activant les récepteurs AMPA, a fait l'objet d'une étude randomisée placebo-contrôlée (Berry-Kravis *et al.*, 2006). L'issue primaire de l'étude (une évaluation de la mémoire) a été négative. Aucune amélioration comportementale n'a été observée chez les participants.

La minocycline, une tétracycline capable d'inhiber la MMP9, a également été étudiée. Une petite étude ouverte avait d'abord été réalisée par (Paribello *et al.*, 2010), dont les résultats étaient positifs (amélioration de l'ABC-C, du CGI et du VAS). Ensuite, une étude randomisée placebo-contrôlée de (Leigh *et al.*, 2013) a également fourni des résultats prometteurs. Dans cette étude, les participants ont eu une amélioration significative du CGI, des comportements anxieux et de l'humeur. Cependant, le score global des échelles VAS, EVT-2 et VABS est resté inchangé, tout comme le score des sous-échelles ABC-C_{FX}.

Les études cliniques sur les agonistes GABA ont également fourni des résultats décevants. Notamment, une étude randomisée placebo-contrôlée de (Berry-Kravis *et al.*, 2012) sur l'arbaclofène a produit des résultats négatifs. Plus récemment encore, une étude randomisée contrôlée de (Ligsay *et al.*, 2017) sur la ganaxolone a également produit des résultats négatifs.

Enfin, le riluzole et l'acamprosate, des molécules combinant des propriétés GABAergique et antiglutamatergique ont fait l'objet de deux petites études ouvertes (Erickson *et al.*, 2011, Erickson *et al.*, 2013) aux résultats mitigés.

D'autres molécules ont fait l'objet de petites études ouvertes ou de rapports de cas anecdotiques. Parmi ces thérapies expérimentales, la bumetanide (un diurétique de l'anse) a fait l'objet d'un rapport de cas positif (Lemonnier *et al.*, 2013). La L-acétylcarnitine, a également fait l'objet de deux petites études randomisées contrôlées dont l'issue était négative (Rueda *et al.*, 2015).

En somme, on retient que chez l'humain, les études cliniques pharmacologiques sur le SXF ont malheureusement démontré des résultats négatifs ou mitigés. Ces résultats décevants surprennent, compte tenu des résultats très prometteurs ayant été obtenus chez le modèle murin du SXF. De nombreuses théories peuvent être avancées afin d'expliquer la discordance entre les résultats chez les souris *Fmr1* KO et les individus avec SXF :

- Le SXF étant une maladie neurodéveloppementale, il est possible que les individus

qui en sont atteints ne puissent être traités que durant la jeune enfance, puisque c'est à cette période que le développement des dendrites et des réseaux neuronaux est le plus actif. Peut-être qu'au-delà d'un certain âge critique, le potentiel d'amélioration cognitive des individus avec SXF n'est que très limité.

- Les études cliniques réalisées jusqu'à ce jour n'étaient que d'une durée très brève (trois mois ou moins). Même si une molécule pouvait efficacement améliorer le fonctionnement neuronal, il est probable qu'une période d'observation aussi courte ne permette pas de déceler d'amélioration dans la cognition ou le comportement chez les participants.
- L'utilisation d'échelles comportementales afin de quantifier l'issue clinique des études est également problématique. En effet, les échelles utilisées (ex : VABS, ABC-C, etc.) ont généralement des propriétés psychométriques assez insensibles et n'ont pas été spécifiquement validées chez des individus avec SXF. Il est donc difficile d'observer une amélioration significative du comportement en utilisant ces échelles.
- Il est probable qu'un important effet placebo ait été observé dans les études cliniques précédentes. Malheureusement, un grand effet placebo dans le groupe contrôle rend plus difficile l'observation d'une amélioration significative dans le groupe expérimental. En cas d'effet placebo important, la taille d'effet des résultats et la puissance des études sont diminuées.
- Enfin, nous pouvons nous questionner à savoir si notre compréhension théorique du SXF est juste. Il est malheureusement possible que nos modèles d'étude privilégiés (la souris *Fmr1* KO, la drosophile *dfmrp* KO et le rat *Fmr1* KO) ne représentent pas avec justesse les anomalies physiopathologiques responsables du SXF chez l'humain.

L'absence de biomarqueur objectif pouvant démontrer une réponse au traitement est également un problème auquel font face les cliniciens désirant identifier des traitements pour le SXF. Avoir des biomarqueurs tissulaires périphériques permettant d'objectiver la normalisation de certaines anomalies physiopathologiques du SXF faciliterait l'identification des traitements les plus prometteurs et permettrait même de prédire quels individus auraient plus de chances d'y répondre favorablement (Berry-Kravis *et al.*, 2013).

Tel que précisé à la section 1.8, mon projet constitue un effort vers l'identification de tels biomarqueurs.

Bien que les résultats des études cliniques aient jusqu'à maintenant été décevants, des lueurs d'espoir persistent pour les patients et leurs proches : notre compréhension du SXF progresse aujourd'hui plus rapidement que jamais, et d'autres thérapies prometteuses sont sur les bancs d'essais. Parmi les molécules les plus intéressantes, la lovastatine retient particulièrement l'attention.

1.5 La lovastatine : un traitement prometteur du SXF

Tel que noté précédemment, la voie de signalisation MAPK/ERK semble être hyper-activée dans le SXF, et l'inhibition de cette cascade représente une cible thérapeutique intéressante. La lovastatine, semble être un choix thérapeutique prometteur pour arriver à cette fin. Comme nous le verrons en détail ci-dessous, il s'agit d'une molécule sécuritaire, déjà prescrite depuis de nombreuses années pour le traitement de l'hypercholestérolémie. Des études précliniques chez la souris *Fmr1* KO ainsi qu'une étude ouverte chez l'humain confirment l'intérêt apporté à cette molécule (Çaku *et al.*, 2014; Osterweil *et al.*, 2013).

1.5.1 Métabolisme du cholestérol, action de la lovastatine et rationnelle thérapeutique dans le SXF

Le cholestérol est une molécule dont l'utilité est primordiale au bon déroulement de nombreux processus physiologiques. Notamment, le cholestérol est essentiel à la formation des hormones stéroïdiennes et de la vitamine D₃ endogène et il représente une composante essentielle des membranes cellulaires. Outre le cholestérol provenant de notre alimentation, le corps humain peut également compter sur sa capacité à produire du cholestérol endogène. Bien que nos hépatocytes soient les principales cellules produisant le cholestérol, les enzymes responsables de sa production sont exprimées de manière ubiquitaire afin que toutes les cellules nucléées puissent en produire une certaine quantité. Les processus biochimiques impliqués dans la production et le métabolisme du cholestérol sont ici expliqués. Une bonne

compréhension de ces mécanismes est nécessaire afin de comprendre l'effet de la lovastatine et les répercussions engendrées par l'usage de cette molécule.

Le cholestérol est un lipide comprenant quatre cycles carbonés et un groupe hydroxyle sur le carbone 3 (Voir figure 6). Ce groupe hydroxyle confère au cholestérol des caractéristiques amphiphiles ainsi qu'une polarité et une légère solubilité en milieu aqueux.

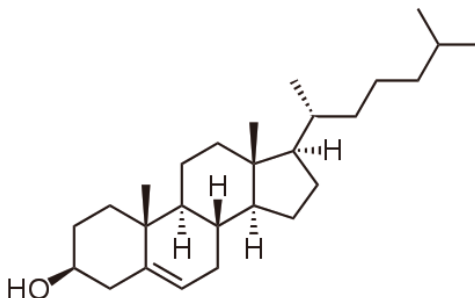


Figure 6 : Structure chimique du cholestérol.⁴

Tel qu'exprimé précédemment, toutes les cellules nucléées du corps ont la capacité de produire une certaine quantité de cholestérol. Cette synthèse se produit entièrement au niveau du cytoplasme grâce à une panoplie d'enzymes cytosoliques ou présentes à la surface du réticulum endoplasmique. L'acétyl-CoA (pouvant notamment provenir de la β -oxydation des acides gras ou de la déshydrogénation du pyruvate) sert de point de départ à la production du cholestérol, celui-ci étant d'abord condensé en Acétoacétyl-CoA, qui lui-même est transformé en HMG-CoA. Ces deux réactions réversibles de condensation sont respectivement catalysées par la thiolase et la HMG-CoA synthase. L'HMG-CoA est par la suite irréversiblement transformée en mévalonate via l'enzyme HMG-CoA réductase catalysant l'oxydo-réduction du NADPH. Cette réaction est d'une importance capitale, puisqu'il s'agit de l'étape limitante dans la voie de synthèse du cholestérol (Cerqueira *et al.*, 2016). À ce titre, l'enzyme HMG-CoA réductase est la cible thérapeutique de la lovastatine. Comme nous le verrons par après, l'inhibition de l'enzyme HMG-CoA réductase par la lovastatine réduit la production de tous les lipides produits en aval de cette enzyme (Vasawala *et al.*, 2015).

⁴ Image du domaine public. <https://fr.wikipedia.org/wiki/Cholestérol#/media/File:Cholesterol.svg>

Le mévalonate est le premier intermédiaire unique à la voie de synthèse du cholestérol. Celui-ci est séquentiellement transformé en divers composés collectivement nommés isoprénoïdes. Plus spécifiquement le mévalonate est phosphorylé par trois kinases puis décarboxylé en isopentényl-pyrophosphate (IPP). À partir de ce point l'IPP peut être converti en géranyl-pyrophosphate (GPP) puis en farnésyl-pyrophosphate (FPP)⁵. Tel que décrit à la section 1.3.5, le farnésyl-pyrophosphate est un composé nécessaire à la prénylation de certaines protéines tel que la protéine Ras en amont de la cascade MAPK/ERK. Une explication détaillée des autres étapes de la synthèse du cholestérol dépasserait le cadre du présent travail. Une présentation de cette voie métabolique est cependant illustrée par la figure 7 (Cerqueira *et al.*, 2016).

⁵ Faisons remarquer que la transformation de l'IPP en GPP puis en FPP est ici une simplification des processus biochimiques pouvant survenir. L'IPP peut notamment être transformé directement en FPP ou en 3,3-diméthylallyl-pyrophosphate, ce dernier pouvant par la suite être retransformé en HMG-CoA.

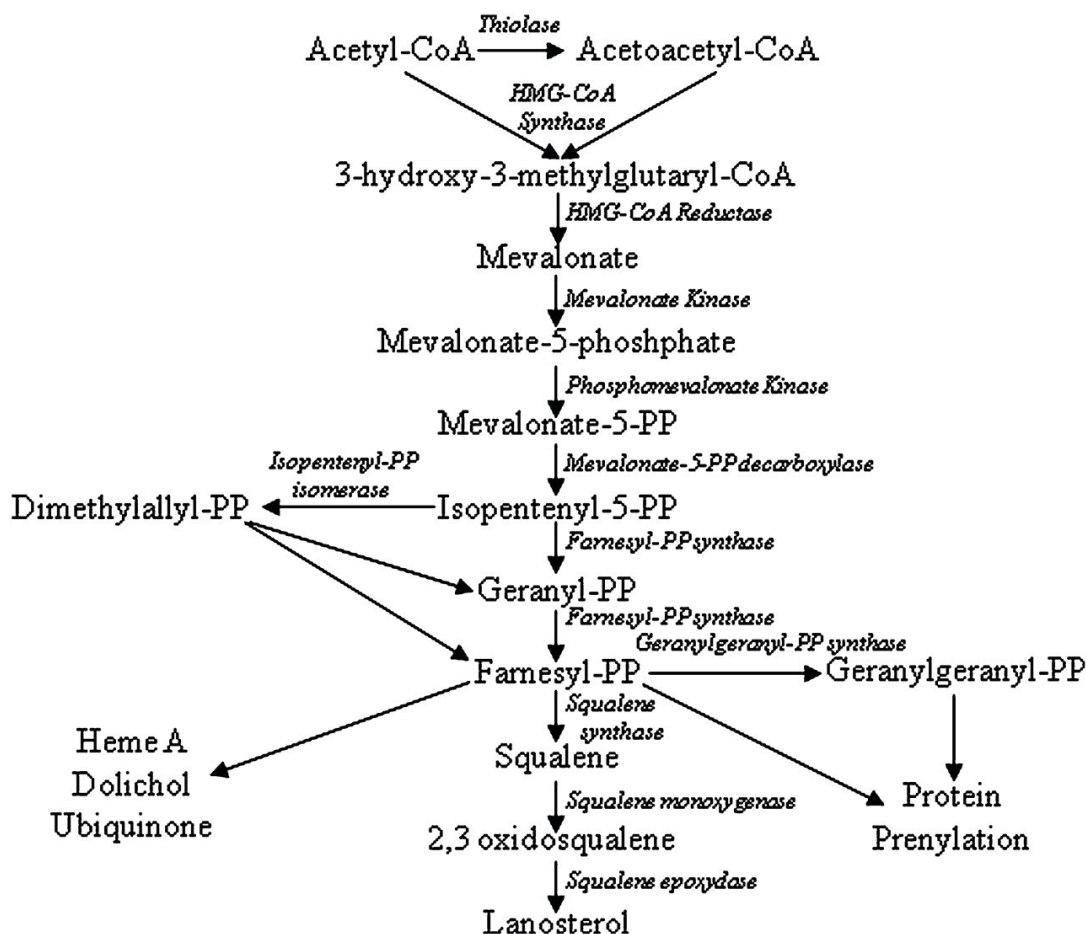


Figure 7 : Voie de synthèse du cholestérol.⁶ (Porter et Herman, 2011)

Tel qu'expliqué à la section 1.3.5, l'ajout de FPP à la protéine Ras est nécessaire à son recrutement membranaire au niveau des radeaux lipidiques et à son activation. La protéine Ras étant au sommet de la cascade MAPK/ERK, il est donc possible d'inhiber cette cascade en diminuant la production endogène de FPP et de cholestérol. Puisque la lovastatine bloque l'action de l'enzyme HMG-CoA réductase, cette statine diminue la synthèse de FPP et de cholestérol, inhibant du même coup la cascade MAPK/ERK. La lovastatine pouvant donc freiner la voie MAPK/ERK, cela pourrait potentiellement corriger l'une des anomalies signalétiques les plus importantes dans la physiopathologie du SXF. Cette capacité à normaliser les anomalies signalétiques lui confère un potentiel thérapeutique prometteur.

⁶ Cette figure était initialement publiée dans le *Journal of Lipid Research*. Porter, F. D., & Herman, G. E. (2011). *Malformation syndromes caused by disorders of cholesterol synthesis*. *Journal of Lipid Research*, 52(1), 6-34. © The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

1.5.2 Propriétés pharmacologiques de la lovastatine

Les statines sont une classe de médicaments ayant pour cible pharmacologique l'enzyme HMG-CoA réductase, responsable de la conversion du HMG-CoA en mévalonate. Toutes les statines possèdent une moitié analogue aux molécules endogènes d'HMG-CoA, ce qui leur permet de former de nombreux ponts hydrogènes sur le site actif de l'enzyme HMG-CoA réductase. Cette association forte mais réversible provoque également une modification dans la conformation de l'enzyme, celle-ci perdant son pouvoir catalytique (Alberts *et al.*, 1980; Apotex Inc., 2014; Sandoz Canada Inc., 2014). Fait important, aux doses thérapeutiques, les statines n'inhibent l'enzyme HMG-CoA réductase que de manière incomplète, ce qui permet encore aux cellules de produire les petites quantités de mévalonate nécessaires aux besoins métaboliques.

La lovastatine est une pro-droge administrée oralement sous forme de lactone inactive, qui est ensuite rapidement transformée *in vivo* en métabolites actifs par les enzymes hépatiques microsomales (isoforme 3A4 du cytochrome P450). Les principaux métabolites actifs à chaîne ouverte de la lovastatine sont l'acide β -hydroxylé et les dérivés 6'-hydroxylé, 6'-hydroxyméthylé et 6'-exométhylène, toutes ces molécules ayant une grande affinité pour le site actif de l'enzyme HMG-CoA réductase (Apotex Inc., 2014; Sandoz Canada Inc., 2014).

La lovastatine est commercialisée et indiquée à doses de 20 à 80 mg PO comme traitement pour abaisser les taux de cholestérol total et de LDL chez les individus atteints d'hypercholestérolémie avec taux de triglycérides élevé (type IIb) ou normal (type IIa). De nombreuses études effectuées avec les statines ont démontré leur efficacité dans la réduction de la morbidité et de la mortalité d'origine coronarienne. La réduction du LDL par les statines entraîne donc des bénéfices bien établis et reconnus, particulièrement chez les individus à risque élevé d'événements cardio-vasculaires (Apotex Inc., 2014; Sandoz Canada Inc., 2014; Stone *et al.*, 2014).

Une forte extraction hépatique réduit grandement la biodisponibilité de la lovastatine et rend celle-ci variable d'un individu à l'autre. À ce titre, moins de 5% de la dose administrée oralement peut être retrouvée sous forme de métabolites actifs dans le sang. De plus, la lovastatine a une forte affinité pour les protéines plasmatiques, de sorte qu'environ 95% de

ses métabolites sont liés à l'albumine. Aussi, faisons remarquer que la lovastatine administrée par voie orale présente une forte sélectivité pour le tissu hépatique comparativement aux autres tissus et que cette molécule peut efficacement traverser la barrière hémato-encéphalique. Puisque la lovastatine peut facilement traverser la barrière hémato-encéphalique, cette molécule peut altérer la production de cholestérol au niveau cérébral. Cette molécule est donc un choix intéressant, comparativement à de nombreuses autres statines n'ayant pas cette capacité. Enfin, la lovastatine est métabolisée au niveau du foie par l'isoforme 3A4 du cytochrome P450 avant d'être excrétée en très grande majorité (>90%) dans les fèces (Apotex Inc., 2014; Sandoz Canada Inc., 2014).

Bien que la lovastatine puisse entraîner des bénéfices importants pour la santé cardiovasculaire de certains individus, quelques effets secondaires significatifs peuvent également être provoqués par cette molécule. Les premières études de la lovastatine chez l'humain ont permis d'observer une élévation importante et persistante des transaminases sériques (ALT et AST) chez environ 1,6% des adultes ayant reçu de la lovastatine pendant au moins un an. Cette élévation des transaminases sériques n'était dans la plupart des cas associée à aucun autre symptôme laissant suggérer une atteinte hépatique importante (ictère, œdème ou ascite, douleur abdominale, diarrhée, etc.). Les individus ayant éprouvé une telle élévation asymptomatique des transaminases ont vu leur bilan biochimique se rétablir lentement vers des valeurs normales dès la cessation du médicament. Aussi, de très rares cas d'insuffisance hépatique (pouvant même s'avérer mortels) ont été rapportés en raison d'une consommation de statines. Les individus atteints d'une pathologie rénale ou hépatique ou consommant de l'alcool de manière excessive pourraient être plus à risque de subir de telles atteintes iatrogéniques (Apotex Inc., 2014; Sandoz Canada Inc., 2014).

La lovastatine peut également miner l'intégrité des muscles squelettiques. Certains individus éprouvent des myalgies, c'est-à-dire des douleurs musculaires diffusent lors d'un traitement à la lovastatine. Plus rarement, ces douleurs peuvent être accompagnées d'une inflammation des tissus musculaires. On peut diagnostiquer une myosite si cette inflammation musculaire douloureuse est accompagnée d'une élévation de la créatine kinase (CK) sérique à plus de dix fois la valeur normale supérieure. Dans de très rares cas, l'atteinte peut être très extensive et peut mener à la lyse de plusieurs cellules musculaires. Des cas de rhabdomyolyse secondaire aux statines ont été rapportés à quelques occasions et ces atteintes

ont parfois été accompagnées d'insuffisance rénale aiguë secondaire à une myoglobulinurie importante. De tels événements seraient possiblement plus fréquents chez les individus souffrant d'une maladie musculaire sous-jacente, ceux qui pratiquent des exercices physiques extrêmes ou ceux qui ont subi une chirurgie récente (Apotex Inc., 2014; East *et al.*, 1988; Sandoz Canada Inc., 2014).

Puisque l'innocuité de la lovastatine n'a jamais été démontrée chez les femmes enceintes, il est possible que ce médicament provoque des effets tératogènes (Godfrey *et al.*, 2012). De plus, aucune étude ne permet d'affirmer que la lovastatine est sécuritaire lorsque consommée chez des femmes qui allaitent (Apotex Inc., 2014; « Lovastatin: Drug information - UpToDate », s. d.; Sandoz Canada Inc., 2014).

L'essai clinique randomisé EXCEL réalisé chez 8245 participants a permis d'identifier certains autres symptômes pouvant possiblement être causés par la lovastatine (Bradford, 1991). Une liste de ces symptômes est présentée ci-dessous dans le tableau 4. Il est à noter qu'une diminution du cholestérol en dessous des valeurs normales n'a été associée à aucun effet adverse.

Tableau 4 : Effets indésirables connus de la lovastatine

État général	Asthénie
Système musculo-squelettique	Myalgies Myosite Rhabdomyolyse (très rare)
État neuropsychiatrique	Étourdissements Céphalées Dépression Vision embrouillée
Système gastro-intestinal	Douleurs abdominales/épigastriques Constipation Diarrhée Dyspepsie Flatulences Nausées
Système tégumentaire	Éruptions cutanées

Certaines interactions médicamenteuses ou alimentaires sont également susceptibles d'accroître le risque de survenue d'effets secondaires. Par exemple, les pamplemousses peuvent inhiber les enzymes hépatiques microsomaux 3A4 et altérer le métabolisme de la

lovastatine. De plus, l'association d'une statine avec un autre régulateur du métabolisme lipidique (niacine, gemfibrozil et autres fibrates) augmenterait le risque de myopathie. D'autres médicaments tel que la cyclosporine, le danazol, l'amiodarone et le vérapamil augmentent également le risque de myopathie et de rhabdomyolyse. Pour leur part, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine peuvent accroître la sévérité des hyperkaliémies en situation de rhabdomyolyse. Enfin, la lovastatine étant un substrat des enzymes lysosomales du CYP3A4, son taux sérique peut être accru chez les patients recevant de manière simultanée un inhibiteur puissant du CYP3A4. Ces substances sont l'itraconazole, le kétoconazole, l'érythromycine, la clarithromycine, la télichromycine, les inhibiteurs de la protéase utilisés chez les séropositifs VIH et la néfazodone (Apotex Inc., 2014; « Lovastatin: Drug information - UpToDate », s. d.; Sandoz Canada Inc., 2014).

1.5.3 Étude de la lovastatine chez la souris *Fmr1* KO

En 2013, une étude remarquable publiée par Osterweil *et al.* a montré les bénéfices thérapeutiques de la lovastatine chez la souris *Fmr1* KO (Osterweil *et al.*, 2013). Cette recherche a démontré plusieurs résultats intéressants. D'abord, de manière cohérente avec le cadre théorique énoncé précédemment, la lovastatine a été capable d'inhiber partiellement la voie de signalisation MAPK/ERK. Cette inhibition de MAPK/ERK par la lovastatine a permis de normaliser le taux de synthèse protéique dans des lysats cellulaires hippocampiques. De plus, toujours chez la souris *Fmr1* KO, la lovastatine a normalisé la LTD induite par l'activation des récepteurs mGluR1/5. *In vitro*, la lovastatine était capable de prévenir l'activité épileptogénique induite par l'activité mGluR au niveau hippocampique et corrigeait l'hyperexcitabilité du cortex visuel. *In vivo*, la lovastatine *per os* (PO) était capable de diminuer significativement l'incidence de crises d'épilepsie chez les souris *Fmr1* KO. En somme, par son effet inhibiteur sur la protéine Ras et la voie MAPK/ERK, la lovastatine a été capable de corriger des anomalies signalétiques et des manifestations pathologiques dans un modèle murin du SXF. Évidemment, ces résultats prometteurs ont encouragé à effectuer une étude clinique de la lovastatine chez des individus atteints du SXF.

1.5.4 Étude de la lovastatine chez des individus avec SXF : effets cliniques et biochimiques du traitement

L'étude réalisée dans notre laboratoire (Çaku *et al.*, 2014) a été la première étude clinique de la lovastatine chez des individus avec SXF. Le protocole de cette étude ouverte a permis d'administrer de la lovastatine en doses croissantes (jusqu'à 40 mg PO quotidiennement) à un total de 15 individus atteints du SXF. Treize des patients étaient des hommes et l'âge des participants variait de 10 à 31 ans. Chez les participants, la lovastatine a été très bien tolérée, et seuls des effets secondaires mineurs ont été rapportés. Une amélioration significative du comportement des individus a été observée grâce au score global ABC-C (issue primaire, $P < 0,005$). Les issues secondaires de l'étude ont également été positives, puisque des améliorations significatives ont notamment été observées sur les échelles CGI-I ($P < 0,002$) et VABS-II ($P < 0,001$). En plus des résultats cliniques encourageants de cette étude, des échantillons sanguins ont également été prélevés chez les participants de l'étude. Ces échantillons ont été prélevés au début de l'étude (avant de commencer à recevoir la lovastatine), puis après 12 semaines de traitement avec lovastatine 40 mg PO une fois par jour. Ces échantillons sanguins ont été manipulés conformément au protocole présenté dans la section 2 (matériel et méthodes) afin de produire des lysats plaquettaires dans une solution de tampon d'échantillon *buffer* contenant notamment 2% de dodécylsulfate de sodium (SDS). Dans le cadre de mon projet de maîtrise, des analyses protéomiques LC-MS/MS de ces échantillons ont été effectuées.

Une autre étude de notre laboratoire publiée en 2016 par Pellerin *et al.* s'est intéressée à la phosphorylation d'ERK dans les lysats plaquettaires prélevés durant l'étude de Çaku *et al.* (2014) (Pellerin *et al.*, 2016). Ces travaux ont révélé que la phosphorylation d'ERK était bel et bien diminuée par l'administration de lovastatine. De plus, la normalisation d'ERK était partiellement corrélée à la réponse clinique des participants (Pellerin *et al.*, 2016).

Tel qu'expliqué à la section suivante, les plaquettes sanguines sont un intéressant modèle d'étude périphérique des neurones. L'étude de ces cellules pourrait éventuellement permettre d'identifier des biomarqueurs permettant d'objectiver la normalisation de certaines anomalies physiopathologiques du SXF, ce qui faciliterait l'identification des traitements les plus prometteurs (Berry-Kravis *et al.*, 2013).

1.6 Les plaquettes sanguines : un modèle d'étude périphérique des neurones

Les plaquettes sanguines sont des cellules présentes dans le sang. De nombreuses évidences suggèrent que ces cellules reproduisent fidèlement plusieurs processus signalétiques présents dans les neurones, de sorte qu'il s'agirait d'un modèle d'étude intéressant des processus qui s'y déroulent. Les plaquettes sanguines pouvant être perçues comme une fenêtre donnant sur le fonctionnement neuronal, la présente section décrit donc les caractéristiques de ces cellules et confirme l'intérêt porté à l'étude de leur protéome.

1.6.1 Les plaquettes sanguines : fenêtre sur le fonctionnement neuronal

Pour des raisons évidentes, il est difficile d'étudier la physiopathologie des maladies neuropsychiatriques sur des tissus cérébraux humains. Bien qu'on puisse recourir à des modèles animaux, à des analyses de tissus post-mortems ou à des études cellulaires *in vitro* afin de connaître les processus biochimiques causant ces maladies, ces techniques expérimentales présentent de nombreux inconvénients. L'utilisation de cellules périphériques reproduisant fidèlement les processus en cours dans les neurones représente une solution intéressante à cette problématique (Asor, 2012; Camacho et Dimsdale, 2000). Notamment, les plaquettes sanguines sont présentes en grande quantité dans le sang et peuvent être isolées de manière simple et minimalement invasive à un haut degré de pureté (Lessard *et al.*, 2012). Surtout, de nombreuses études ont révélé des similitudes morphologiques et biochimiques entre les plaquettes et les neurones. Les paragraphes suivants présentent certaines des ressemblances entre les plaquettes et les neurones qui justifient l'usage de ce modèle cellulaire pour étudier le SXF.

D'abord, comme il sera vu à la section 1.6.3, les plaquettes contiennent des granules pouvant être libérées par exocytose lors de leur activation. Or, les mécanismes de libération des granules plaquettaires sont très similaires au processus permettant la libération de neurotransmetteurs dans les fentes synaptiques. D'ailleurs, les plaquettes emmagasinent dans leurs granules et sécrètent de nombreux neurotransmetteurs, dont le glutamate, la sérotonine, le GABA et certaines monoamines. Les plaquettes possèdent même des récepteurs pour ces différentes substances tels que les récepteurs NMDA, AMPA et 5-HT₂, ce qui en fait un modèle d'étude intéressant des synapses glutamatergiques (Baier *et al.*, 2009; Berk *et al.*, 2000; Boyanova *et al.*, 2012).

Les plaquettes sanguines expriment et utilisent également plusieurs voies de signalisation importantes au niveau du système nerveux central. Par exemple, les voies de signalisation MAPK/ERK et PI3K/Akt/mTOR sont très importantes au sein de ces cellules (Boyanova *et al.*, 2012; Hunter *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010). Dans le SXF, de nombreuses études suggèrent que des altérations signalétiques identiques soient observées dans les neurones et les plaquettes. Notamment, une diminution de l'AMPc (Berry-Kravis et Sklena, 1993; Kelley *et al.*, 2007) et une augmentation de l'activité d'ERK (Pellerin *et al.*, 2016) sont observées dans ces deux modèles cellulaires.

Les travaux de notre laboratoire ont également révélé la présence de la protéine FMRP dans les plaquettes sanguines et dans les mégacaryocytes. Lessard *et al.* (2012) ont d'ailleurs démontré que la quantité de FMRP dans les plaquettes (mesurée par WB) est cliniquement corrélée à la sévérité de l'atteinte cognitive des individus avec SXF (Lessard *et al.*, 2012).

Enfin, mentionnons que les plaquettes sanguines ont été employées comme modèle périphérique des neurones afin d'étudier la physiopathologie et de trouver des biomarqueurs dans plusieurs maladies neuropsychiatriques telles que la maladie d'Alzheimer, la dépression et la schizophrénie (Asor, 2012; Baier *et al.*, 2009; Berk *et al.*, 2000). L'ensemble des constatations énumérées ci-dessus suggère que les plaquettes sont un modèle cellulaire pratique et fiable afin d'étudier la physiopathologie du SXF.

1.6.2 Fonction physiologique des plaquettes sanguines

Les plaquettes sanguines sont des cellules ayant un rôle primordial dans l'hémostase primaire. En cas de dommage vasculaire, l'hémostase est un processus impliquant une interaction étroite entre les plaquettes sanguines, la paroi endothéliale du vaisseau et les facteurs de coagulation. Les plaquettes ont pour rôle de colmater les sites de dommage vasculaire. Ce colmatage s'effectue par quatre mécanismes : l'adhésion, l'agrégation, la sécrétion de granules et la stimulation de la cascade de coagulation (Hoffbrand et Moss, 2016).

L'adhésion est un processus par lequel les plaquettes se collent directement à la paroi vasculaire endommagée. L'adhésion à l'endothélium est principalement médiée par les récepteurs GPIa, GPIb et GPIIb/IIIa à la surface des plaquettes. Formant un pont entre les

molécules de collagènes de l'endothélium et les récepteurs GPIb et GPIIb/IIIa, le facteur de von Willebrand (vWF) est une protéine nécessaire au processus d'adhésion (Broos *et al.*, 2012; Hoffbrand et Moss, 2016; Michelson, 2007).

L'agrégation est un processus par lequel les plaquettes sanguines se collent les unes aux autres. Ce processus s'opère par l'activation de leurs récepteurs GPIIb/IIIa qui adhèrent fermement au fibrinogène environnant. Il en résulte un amas de plaquettes empilées les unes contre les autres : le clou plaquettaire (Broos *et al.*, 2012).

Lorsqu'elles sont activées par un dommage vasculaire, les plaquettes sanguines libèrent par exocytose leurs granules notamment riches en ADP, en vWF et en PDGF, dont l'effet active les autres plaquettes environnantes. Les plaquettes activées produisent également la thromboxane A₂ dont le rôle est aussi d'amplifier l'activité des plaquettes voisines et d'induire une vasoconstriction du vaisseau lésé (Michelson, 2007).

Lors de l'hémostase, les phospholipides à la surface des plaquettes sont nécessaires à la formation de certains facteurs de coagulation. Plus particulièrement, les phospholipides membranaires catalysent de manière calcium-dépendante la formation de facteur Xa et de thrombine (Hoffbrand et Moss, 2016).

Il est à noter qu'aucune anomalie de la fonction plaquettaire n'a été objectivée chez les individus souffrant du SXF. Bien qu'une hyperphosphorylation d'ERK ait été démontrée chez ces individus (Pellerin *et al.*, 2016), cette altération n'affecte pas de manière importante le recrutement des plaquettes dans l'hémostase. Ainsi, chez les individus avec SXF, les plaquettes peuvent toujours être activées par la stimulation de leurs récepteurs membranaires (ex : GPIIb/IIIa) de sorte qu'elles conservent de manière inaltérée leur fonction dans l'hémostase.

1.6.3 Structure des plaquettes

Les plaquettes sont très petites, ayant un diamètre variant de 2 à 5 μm et un volume généralement compris entre 6 et 10 fL (Hoffbrand et Moss, 2016; Michelson, 2007). Lorsqu'elles sont en libre circulation sous leur forme inactive, les plaquettes ont une conformation discoïde biconvexe, mais leur forme peut cependant changer dramatiquement

en cas d'activation. Les principales caractéristiques structurelles de ces cellules seront ici décrites (Escolar *et al.*, 1986).

D'abord, étant formées à partir du cytosquelette des mégacaryocytes (un processus décrit à la section 1.6.4), les plaquettes ne disposent d'aucun noyau cellulaire. Notons également que les plaquettes d'individus normaux ne contiennent pas de réticulum endoplasmique rugueux, de polyribosomes ou d'appareil de Golgi, ces organelles ayant été détruites lors de la transformation des mégacaryocytes en plaquettes (Michelson, 2007). L'absence de ces organelles suggère que les plaquettes aient un protéome stable, puisque la traduction d'ARNm en protéines serait chez-elles quasiment inexistantes (Bahou, 2012).

La membrane des plaquettes est sillonnée de petites nervures, ce qui leur confère une apparence rugueuse et augmente leur surface de contact avec le milieu qui les environne. De petites ouvertures à la surface des plaquettes permettent une communication entre le milieu extracellulaire et leur système canaliculaire ouvert (Selvadurai et Hamilton, 2018). Le système canaliculaire ouvert est un vaste réseau de canaux qui sillonnent l'intérieur de la plaquette, permettant d'absorber des protéines plasmatiques et conférant une très large surface de réaction. La membrane et le système canaliculaire ouvert des plaquettes sont riches en phospholipides servant à catalyser l'activation du facteur X et la formation de thrombine durant la cascade de coagulation (Hoffbrand et Moss, 2016).

La périphérie de la plaquette se distingue également par la présence d'un recouvrement extérieur (le glycocalyx) très riche en glycoprotéines s'activant lors de l'hémostase. Parmi les glycoprotéines les plus importantes à l'agrégation, citons entre autres les complexes GPIIb/IIIa, GPIa et GPIb.

Les plaquettes possèdent un cytosquelette formé par un très dense réseau de microtubules de tubuline polymérisée et de microfilaments d'actine et de myosine. Lorsque les plaquettes sont inactives, ce cytosquelette sert notamment à supporter leur forme discoïde et à maintenir les organelles séparées les unes des autres (Escolar *et al.*, 1986). Lorsque les plaquettes s'activent, les microfilaments permettent de sécréter le contenu des granules dans le système canaliculaire ouvert (Escolar *et al.*, 1986; White et Krumwiede, 1987) et de modifier la forme des plaquettes.

Les plaquettes contiennent quelques organelles. Parmi celles-ci, mentionnons l'existence de mitochondries et de trois types d'organelles pouvant être sécrétées : les

granules α , les corps denses et les lysosomes. Chaque plaquette contient entre 40 et 80 granules alpha sphériques et d'un diamètre de 200 à 500 nm (Reed, 2004). Lorsque les plaquettes s'activent, les protéines pro-coagulantes contenues dans les granules α (vWF, facteur V, P-sélectine, thrombospondine et fibrinogène) sont libérées dans le système canaliculaire ouvert. Les corps denses sont également des organelles sécrétées lors de l'activation plaquettaire. Bien que leur contenu diffère de celui des granules alpha, les corps denses contiennent aussi des substances favorisant l'hémostase : ils sont riches en ADP, en sérotonine, en pyrophosphate, en calcium et en magnésium. Présents en petits nombres, la fonction des lysosomes dans les plaquettes et l'hémostase n'est à ce jour pas comprise. Il est possible que ces organelles soient des vestiges inutiles hérités des mégacaryocytes. Enfin, les mitochondries sont bel et bien actives au sein des plaquettes et les études démontrent qu'elles sont capables de supporter leurs besoins énergétiques (Michelson, 2007).

1.6.4 Formation des plaquettes à partir des mégacaryocytes

Les mégacaryocytes sont issus de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes retrouvées au niveau de la moelle osseuse. Suite à divers stimuli hormonaux (notamment via la thrombopoïétine, l'IL-3 et l'IL-6), ces cellules souches se spécialisent progressivement en mégacaryocytes (Ogawa, 1993).

Au cours de leur développement, les mégacaryocytes deviennent polyploïdes (*i.e.* leur noyau cellulaire contient un nombre anormalement élevé de chromosomes) par un processus d'endomitose. Ce phénomène implique des duplications successives du bagage génétique de la cellule sans division cellulaire. Tout laisse croire que ce phénomène permette aux mégacaryocytes d'augmenter leur capacité à synthétiser des protéines (Raslova, 2003).

Après ses endomitoses, le mégacaryocyte connaît une période de maturation de son cytoplasme. Durant cette période, la cellule produit une quantité importante de protéines qui seront éventuellement nécessaires au bon fonctionnement des plaquettes sanguines (Geddis, 2010). Trois éléments structuraux importants sont notamment produits durant cette phase : le système de démarcation membranaire (un vaste réseau de membranes nécessaire à la formation des plaquettes), le système tubulaire dense (qui deviendra ensuite le site de production des prostaglandines au sein des plaquettes) et les granules (contenant des

protéines permettant aux plaquettes de bien s'agréger lors de l'hémostase) (Michelson, 2007).

Des études ont démontré que les mégacaryocytes sont capables de transporter des ARNm par des mécanismes très similaires à ceux permettant de transporter des ARNm du corps des neurones jusqu'à leurs dendrites. Notamment, les mégacaryocytes partagent avec les neurones de nombreuses protéines servant au transport des ARNm tel que CASC3, STAU1 et STAU2. De plus, des expériences menées par McCoy et al. (2016) dans notre laboratoire suggèrent que FMRP jouerait un rôle important dans le transport des ARNm à l'intérieur des mégacaryocytes, à l'instar des neurones (McCoy et Corbin, 2015; McCoy *et al.*, 2016).

À ce jour, le mécanisme exact de formation des plaquettes à partir des mégacaryocytes n'a pas encore été pleinement élucidé (Ru *et al.*, 2016). La théorie la plus en vogue stipule qu'au terme de leur processus de maturation, le cytosquelette d'actine et de tubuline du mégacaryocyte se remanie dramatiquement et transforme celui-ci en un amas de longs et minces filaments, similaires à des pseudopodes. Ces filaments entourent le noyau de l'ancienne cellule, puis se scindent en des milliers de proplaquettes. Enfin, ces dernières se diviseraient à nouveau pour former des plaquettes sanguines (Michelson, 2007; Ru *et al.*, 2016).

En somme, nous retenons que les mégacaryocytes sont les précurseurs des plaquettes sanguines. Ces cellules métaboliquement très actives lèguent aux plaquettes l'ensemble des protéines dont elles auront besoin pour assumer leur fonction biologique. Une fois en circulation, les plaquettes ont une durée de vie normale entre 7 et 10 jours (Hoffbrand et Moss, 2016). Passé ce délai, les plaquettes n'ayant pas été activées lors de l'hémostase sont éliminées par le système réticulo-endothélial au niveau de la rate.

1.6.5 Cascades signalétiques dans les plaquettes

Comme vu précédemment, les plaquettes peuvent être activées et recrutées dans l'hémostase. Cette activation nécessite l'activation des récepteurs membranaires de la plaquette puis la transduction du signal grâce à des voies de signalisation. Tel que décrit ci-

dessus, ces phénomènes culminent par la synthèse de TXA_2 , la libération de granules et la réorganisation du cytosquelette plaquettaire afin que celles-ci participent à la coagulation.

Quelques voies de signalisation permettent à la plaquette d'être activée, tel que la voie MAPK/ERK (Rosado et Sage, 2002). Dans les plaquettes, l'activation des intégrines provoquerait un recrutement de la PLC, puis de la PKC et de la voie MAPK/ERK. Cette cascade s'opère de manière identique dans les plaquettes et dans les neurones : par la phosphorylation successive des protéines Ras, Raf, MEK et ERK. Dans les plaquettes, l'activation de MAPK/ERK ne provoquerait pas d'activation de la traduction des ARNm (Zimmerman et Weyrich, 2008), mais stimulerait la synthèse de TXA_2 et la sécrétion des granules α (Li *et al.*, 2010).

1.6.6 Étude des protéines plaquettaires et spectrométrie de masse en tandem

Tel que vu précédemment, les plaquettes n'ont pas de noyau cellulaire et ne contiennent pas de polyribosomes ou de RER visibles. Presque toutes les protéines dans les plaquettes sont donc héritées de leurs précurseurs, les mégacaryocytes. Malgré tout, quelques protéines plasmatiques pénétrant le système canaliculaire ouvert ou acquises par endocytose ou pinocytose peuvent se retrouver dans les plaquettes. En cas d'activation, celles-ci seraient également capables de produire un nombre limité de protéines (Zimmerman et Weyrich, 2008). Diverses techniques expérimentales permettent d'étudier les protéines dans les plaquettes. Les approches protéomiques de type *shotgun* ont pour objectif d'identifier un très grand nombre de protéines dans un échantillon cellulaire. Aujourd'hui, la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) est particulièrement utile afin d'atteindre une caractérisation approfondie du protéome cellulaire. Puisqu'il s'agit de la technique d'analyse employée dans le cadre de mon projet, le paragraphe suivant en résume le fonctionnement.

Afin d'effectuer une analyse MS/MS, les protéines contenues dans un échantillon doivent d'abord être dénaturées afin d'exposer leur structure peptidique. Les protéines dénaturées sont ensuite digérées à l'aide d'une enzyme (ex : trypsine), qui clive chacune d'elles en une séquence caractéristique de peptides. Des techniques de chromatographie en phase liquide ou de 2D-DIGE permettent ensuite de séparer les peptides selon leurs caractéristiques chimiques, avant que ceux-ci soient injectés dans l'appareil MS/MS. Afin d'identifier et de quantifier les protéines, un premier spectromètre de masse ionise les

peptides, puis un champ électromagnétique permet de séparer ceux-ci selon leur ratio masse/charge (m/z). Les peptides triés sont ensuite fragmentés dans un second spectromètre de masse, puis ces fragments sont à nouveau triés par un champ magnétique selon leur ratio m/z . Au final, l'appareil MS/MS génère un ensemble de spectres de détection, puis des algorithmes bio-informatiques complexes sont mis à profit afin d'identifier et de quantifier les protéines de l'échantillon analysé. La signature caractéristique des fragments ionisés permet d'inférer l'identité des peptides triés par le premier spectromètre, et la détection de peptides caractéristiques permet d'identifier et de quantifier avec confiance les protéines dans l'échantillon initial. En somme, une seule analyse LC-MS/MS permet d'identifier et de quantifier des centaines de protéines dans un échantillon.

Burkhart *et al.* (2012) ont étudié le protéome plaquettaire par approche LC-MS/MS. Cette étude a permis d'identifier un total de 4200 protéines différentes dans les plaquettes. Il s'agirait donc de l'étude la plus exhaustive du protéome plaquettaire publiée jusqu'à ce jour. Leurs résultats révèlent que le protéome plaquettaire est particulièrement riche en protéines du cytosquelette (ex : tubuline, actine, myosine) et en protéines importantes pour l'hémostase (protéines des granules alpha et des corps denses). Leur protéome est également enrichi en protéines permettant la transduction du signal intracellulaire (Burkhart *et al.*, 2012).

Les études démontrent également que dans les plaquettes, il n'existe pas d'association entre l'abondance de chaque protéine et de son ARNm. Cette observation est en accord avec la théorie voulant que l'immense majorité du protéome plaquettaire soit stable et acquis des mégacaryocytes.

Bien que l'étude de Burkhart et al. (2012) ne permette pas de conclure sur la variabilité biologique ou inter-individus du protéome plaquettaire, leurs résultats suggèrent qu'environ 85% de ce protéome varie très peu à travers le temps et entre les individus. L'expression des protéines importantes pour l'hémostase varie particulièrement peu entre les individus. Ces résultats sont en accord avec une étude de 2D-DIGE effectuée par Winkler et al. (2008) (Winkler *et al.*, 2008).

Enfin, mentionnons que la base de données *PlateletWeb* (Boyanova *et al.*, 2012) recense les protéines identifiées expérimentalement dans les plaquettes sanguines et leur interactome. Cette base de données représente l'union de 22 listes de données expérimentales et a permis d'identifier 5025 protéines dans les plaquettes.

1.6.7 Effet des statines sur les plaquettes

Quelques études se sont intéressées aux effets des statines sur les plaquettes sanguines. Il est notamment connu que les statines diminuent la concentration de cholestérol dans les plaquettes et leur membrane (Hochgraf *et al.*, 1994; Lijnen *et al.*, 1996; Luzak *et al.*, 2011). De plus, les statines augmenteraient légèrement le volume plaquettaire moyen (Coban et Afacan, 2008; Kucera *et al.*, 2015) et diminueraient la libération de *platelet-derived microparticles* (Nomura *et al.*, 2009; Pawelczyk *et al.*, 2013).

Très peu d'études ont employé des approches protéomiques visant à identifier un grand nombre de protéines ayant été modulées par l'effet des statines. La plupart d'entre-elles utilisaient plutôt des techniques de cytométrie de flux ou de Western Blot pour étudier la modulation de certaines protéines bien spécifiques en réponse à une exposition aux statines. De plus, la majorité des études s'étant intéressées aux effets protéomiques des statines sur les plaquettes étaient des études *in vitro* ou chez des modèles animaux. Un résumé des connaissances sur les modifications protéomiques induites par les statines est présenté ci-dessous dans le tableau 5.

Tableau 5 : Effet connu des statines sur le protéome des plaquettes : résumé des études *in vivo* et *in vitro*

Effet observé sur le protéome	Référence importantes
<i>Altération de l'expression de protéines importantes dans la signalisation</i>	
Augmentation de l'activité de l' <i>endothelial nitric oxide synthase</i> (eNOS), soit par une phosphorylation accrue ou par une expression accrue de la protéine.	(Owens et Mackman, 2014)
	(Yokoyama <i>et al.</i> , 2005)
	(Laufs <i>et al.</i> , 2000)
Augmentation du nombre de récepteurs aux prostacyclines et à la thromboxane au niveau membranaire.	(Kaczmarek <i>et al.</i> , 1993)
Réduction de la petite GTPase RhoA et de sa translocation.	(Owens et Mackman, 2014)
	(Kaneider, 2002)
	(Hamilton <i>et al.</i> , 2010)
<i>Diminution de l'expression membranaire de marqueurs d'activation plaquettaire</i>	
Réduction de CD36 membranaire.	(Puccetti <i>et al.</i> , 2005)
	(Bruni <i>et al.</i> , 2005)

Réduction de l'expression membranaire de CD40-ligand.	(Stach <i>et al.</i> , 2012)
	(Sanguigni, 2005)
	(Pignatelli <i>et al.</i> , 2007)
Réduction de CD63 membranaire	(Tsai <i>et al.</i> , 2011)
	(Schafer, 2005)
	(Huhle <i>et al.</i> , 1999)
Expression membranaire diminuée de sélectine P.	(Dajani <i>et al.</i> , 2002)
	(Huhle <i>et al.</i> , 1999)
	(Cha <i>et al.</i> , 2004)
	(Huhle <i>et al.</i> , 1999)
Diminution de la protéine LOX-1.	(Marwali <i>et al.</i> , 2007)
	(Puccetti <i>et al.</i> , 2005)
	(Bruni <i>et al.</i> , 2005)
<i>Effets variés ayant un impact imprécis sur l'activité plaquettaire</i>	
Augmentation de GRP78	(Molins <i>et al.</i> , 2010)
Expression modulée de 10 protéines dans la fraction cytosolique et de 8 protéines dans la fraction membranaire des plaquettes.	(Molins <i>et al.</i> , 2010)
Diminution de l'expression des récepteurs de l'angiotensine de type I.	(Molins <i>et al.</i> , 2010)

Une revue systématique de la littérature a révélé qu'une seule étude de Molins et al. (2010) a utilisé la spectrométrie de masse pour caractériser les modulations protéomiques induites par une statine dans les plaquettes (Molins *et al.*, 2010). Dans cette étude, des plaquettes de porc ont été incubées *in vitro* avec de la rosuvastatine. Ces plaquettes ont ensuite été perfusées sur une membrane de collagène de type I, puis leur protéome a été séparé par 2D-DIGE. Cette technique d'électrophorèse différentielle a permis d'identifier que la rosuvastatine modulait l'expression de 10 protéines dans la fraction cytosolique et 8 protéines dans la fraction membranaire des plaquettes. Une analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF a finalement révélé la nature de ces protéines modulées, parmi lesquelles figurait la protéine *78-kDa glucose-regulated protein* (GRP78). Quelques limitations méthodologiques de cette étude méritent d'être mentionnées. D'abord, un modèle porcin a été employé, de sorte que ces résultats sont difficilement généralisables à l'effet des statines chez l'humain. Aussi, l'incubation de la rosuvastatine a été faite sur des plaquettes *in vitro*, de sorte que la molécule n'a pas pu influencer le développement du protéome des mégacaryocytes. Enfin, l'analyse protéomique par 2D-DIGE et l'identification MALDI-

TOF des protéines modulées ne permet pas d'avoir une vue d'ensemble des modulations protéomiques induites, le nombre de protéines identifiées lors de cette étude étant très faible.

Outre les études présentées ci-dessus qui se sont intéressées aux modulations protéomiques induites par les statines sur les plaquettes, certaines études se sont intéressées à l'effet des statines sur la signalisation dans les plaquettes. Le tableau 6 ci-dessous présente un résumé des connaissances à ce sujet.

Tableau 6 : Effet des statines sur la signalisation dans les plaquettes

Effet observé sur la signalisation	Référence importantes
<i>Effet sur les voies de signalisation de PKC, PLC et MAPK/ERK</i>	
Phosphorylation diminuée d'ERK et de p38 MAPK.	(Du <i>et al.</i> , 2014)
	(Moscardó <i>et al.</i> , 2013)
Phosphorylation inhibée de la PKC.	(Pignatelli <i>et al.</i> , 2012a)
	(Pignatelli <i>et al.</i> , 2012b)
	(Ali <i>et al.</i> , 2009)
	(Lee <i>et al.</i> , 2010)
Phosphorylation inhibée de la PLC γ 2.	(Lee <i>et al.</i> , 2010)
<i>Autres mécanismes signalétiques contribuant à l'effet antiplaquettaire des statines</i>	
Augmentation de l'AMPc	(Du <i>et al.</i> , 2014)
Augmentation de l'activité des récepteurs PPAR α et PPAR γ .	(Du <i>et al.</i> , 2014)
	(Phipps et Blumberg, 2009)
	(Ali <i>et al.</i> , 2009)
Phosphorylation accrue de VASP.	(Pignatelli <i>et al.</i> , 2012b)
	(Lee <i>et al.</i> , 2010)
	(Schafer, 2005)
	(Du <i>et al.</i> , 2014)
Activité accrue de la guanylyl cyclase.	(Chou <i>et al.</i> , 2008)
Diminution de la phosphorylation d'Akt.	(Du <i>et al.</i> , 2014)
Phosphorylation inhibée de la PLA2.	(Pignatelli <i>et al.</i> , 2012b)
	(Moscardó <i>et al.</i> , 2013)
Phosphorylation diminuée de JNKs.	(Lee <i>et al.</i> , 2010)
<i>Diminution de l'activité de petites GTPases</i>	
Géranlylation diminuée de Rap1b.	(Puccetti <i>et al.</i> , 2002)
Inhibition de la phosphorylation de Rac1.	(Pignatelli <i>et al.</i> , 2012b)
	(Hamilton <i>et al.</i> , 2010)

De manière cohérente avec les travaux de Pellerin et al. (2016), ces études suggèrent notamment que les statines peuvent inhiber la PKC et la voie de signalisation MAPK/ERK dans les plaquettes. L'ensemble des altérations signalétiques et protéomiques décrites dans la littérature suggère que les statines pourraient faiblement inhiber l'activité des plaquettes dans l'hémostase, bien qu'elles ne provoquent pas de modification significative de l'activité des plaquettes lors de tests d'agrégation. En somme, la littérature suggère que les statines peuvent inhiber l'action plaquettaire en diminuant les LDL-oxydés circulants, en modifiant le contenu membranaire des plaquettes et en altérant la signalisation en réponse à l'activation. Ces mécanismes diminuent la sensibilité des plaquettes à différents agonistes et diminuent l'expression membranaire de marqueurs d'activation plaquettaire comme le GPIIb/IIIa, le CD36, le CD40-ligand, le CD63, le facteur tissulaire et la sélectine P. Enfin, mentionnons qu'à notre connaissance, aucune étude n'a révélé l'effet des statines sur les mégacaryocytes.

1.7 Justification, objectifs et hypothèses du projet de recherche

La revue de littérature présentée précédemment démontre que le SXF est une maladie pouvant provoquer un phénotype handicapant et une grande détresse chez les gens qui en sont atteints. De plus, cette maladie représente un fardeau important pour les proches de ceux qui en sont victime. Notre compréhension des mécanismes responsables de la physiopathologie du SXF a grandement évolué, de sorte que nous savons aujourd'hui que l'absence de protéine FMRP engendre des anomalies signalétiques tel qu'une hyperactivation de la voie MAPK/ERK se traduisant en production accrue de protéines au niveau dendritique et en LTD exagérée des neurones. Par son effet inhibiteur sur la synthèse du cholestérol et du farnésyl, la lovastatine permet de corriger cette anomalie signalétique dans le SXF. Elle présente donc un potentiel thérapeutique prometteur.

Dans cette optique, mon projet a pour visée d'explorer le protéome d'individus SXF ayant reçu un traitement de lovastatine. L'objectif de ces analyses est d'identifier des protéines ayant pu être modulées par le traitement reçu. Les protéines identifiées comme ayant été augmentées ou diminuées par la lovastatine formeront une liste de biomarqueurs potentiels de grand intérêt. En effet, les protéines ainsi identifiées pourront être étudiées dans

le cadre de projets futurs, puisque ces protéines pourraient permettre d'expliquer biochimiquement comment la lovastatine peut induire une amélioration clinique dans le SXF.

Notre hypothèse est que l'expression de certaines protéines serait modulée par le traitement à la lovastatine chez les individus avec SXF, mais que ces mêmes protéines resteraient exprimées de façon inchangée chez les individus sains. À l'inverse, nous croyons que la lovastatine induirait certaines modifications dans le protéome des individus sains tandis que ces modifications ne seraient pas observées chez les individus avec SXF. En somme, nous croyons que la lovastatine n'agirait pas de la même façon chez les deux groupes comparés. Cela témoignerait d'un mécanisme d'action du médicament spécifique chez les individus avec SXF.

Afin de connaître les modulations induites par la lovastatine sur le protéome plaquettaire chez des individus avec SXF, j'ai effectué des analyses LC-MS/MS du protéome plaquettaire des échantillons prélevés durant l'étude de Çaku *et al.* (2014). Dans le but d'éventuellement identifier des modulations protéomiques spécifiques aux individus SXF, j'ai également recruté une cohorte d'individus sains, et je leur ai administré de la lovastatine à dose de 40 mg PO une fois par jour. Les échantillons ainsi prélevés pourront éventuellement être analysés par LC-MS/MS afin de comparer les effets de la lovastatine chez les individus sains *versus* ceux avec SXF.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Analyses protéomiques des échantillons d'individus avec SXF (étude LovaX)

2.1.1 Déroulement global de l'étude LovaX

L'étude LovaX a été réalisée par Çaku *et al.* (2014) au sein de notre laboratoire. Une description détaillée de la méthodologie de cette étude dépasserait le cadre du présent travail. Toutefois, mentionnons que des échantillons de plaquettes sanguines ont été prélevés chez les individus avec SXF avant et après traitement à la lovastatine. La figure 8 ci-dessous représente de manière sommaire le déroulement de cette étude.

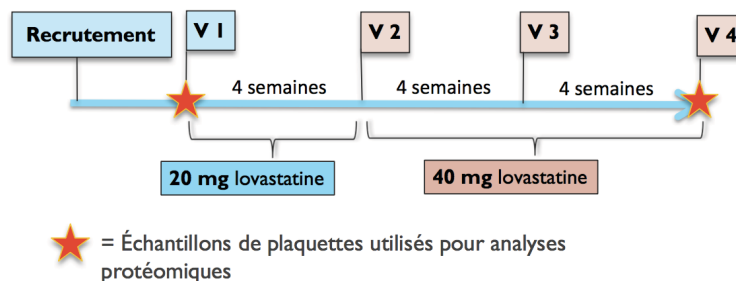


Figure 8 : Représentation schématique du déroulement de l'étude LovaX.

Lors des rencontres #1 et #4 (respectivement V1 et V4), des échantillons de plaquettes sanguines ont été préparés par A. Çaku en suivant un protocole identique à celui publié par Lessard *et al.*, (2012) et décrit à la section 2.3 (Lessard *et al.*, 2012).

2.1.2 Analyses protéomiques des échantillons plaquettaires de l'étude LovaX

Les échantillons de plaquettes préparés par A. Çaku ont été analysés à l'Institut de recherche en immunologie et oncologie (IRIC) de l'Université de Montréal. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE, puis colorées au bleu de Coomassie. Les protéines ont ensuite été digérées sur gel avec de la trypsine.

Lors de la première analyse effectuée sur les échantillons avant/après traitement du participant #4 (échantillons 4V0 et 4V4), la digestion sur gel a été directement faite après l'électrophorèse des protéines et l'injection des peptides a été faite en une seule fraction sur la colonne de chromatographie. Cependant, pour tous les autres échantillons de l'étude

LovaX, nous avons procédé à l'excision de 4 bandes sur les gels de SDS-PAGE avant de procéder à la digestion. Identifiées à l'aide de marqueurs de poids moléculaire, ces zones excisées contenaient les protéines ayant un poids moléculaire compris dans les intervalles suivants : >170 kDa, 65-75 kDa, 50-55 kDa et 40-45 kDa. Les protéines ont ensuite été digérées sur gel. Ces zones ont été excisées, puisqu'une coloration au bleu de Coomassie a révélé qu'elles étaient très riches en protéines. Puisque les protéines les plus abondantes des plaquettes sont les composantes de leur cytosquelette, nous avons excisé ces bandes dans l'espoir de diminuer la quantité de protéines du cytosquelette dans nos échantillons.

Pour chaque échantillon, les peptides ont ensuite été injectés en 2 fractions dans un système *C₁₈ Stem Trap (Optimize Technologies Inc)* et séparés sur une colonne analytique *C₁₈* faite maison (15 cm par 150 μ m) avec un gradient de 116 minutes, de 0-30% d'acétonitrile (0,2% acide formique) et un flot de 600 nL/min sur un système *Ultimate 3000 LC (Dionex)*. La colonne de chromatographie est couplée à un spectromètre de masse *Orbitrap Q-Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific)*.

Chaque spectre MS a été obtenu avec une résolution de 70 000, puis les 12 ions polychargés les plus abondants ont été choisis pour le séquençage MS/MS. Les peptides ont été identifiés avec le logiciel *Peaks 7.5 (Bioinformatics Solution Inc)* et les séquences de peptides ont été comparées à la banque de données *Human Uniprot*. Pour l'identification des protéines, la tolérance a été ajustée à 10 ppm pour l'ion précurseur et à 0,01 Da pour les fragments ioniques. Pour le profilage des protéines, la tolérance a été ajustée à 7 ppm pour l'ion précurseur et à un minimum de 2 peptides. Les modifications post-traductionnelles de carbamidométhylation, d'oxydation et de déamidation ont été considérées.

Le logiciel *Scaffold (version Scaffold_4.4.5, Proteome Software Inc)* a été utilisé pour valider l'identification MS/MS des peptides et des protéines. L'identification d'un peptide a été acceptée s'il pouvait être identifié avec une probabilité >50,0% d'obtenir un *false detection rate* (FDR) <1,0% selon l'algorithme de FDR du logiciel. L'identification d'une protéine a été acceptée si elle pouvait être identifiée avec >5,0% de chance et contenir au moins 2 peptides. La probabilité des protéines a été établie par l'algorithme *Protein Prophet* (Nesvizhskii *et al.*, 2003). Les protéines contenant des peptides similaires et qui ne pouvaient pas être différenciées par analyse MS/MS ont été regroupées pour satisfaire au principe de parcimonie.

La quantification des protéines a été faite à l'aide du logiciel *Scaffold*. La quantité de chaque peptide a été établie en additionnant l'aire sous la courbe du spectre MS/MS pour ses 5 fragments les plus abondants. La quantité de chaque protéine a ensuite été déterminée en additionnant l'aire sous la courbe du spectre MS/MS pour ses 5 peptides les plus abondants. Pour chaque protéine, une normalisation *label free* a été effectuée en tenant compte de la médiane d'intensité de chaque spectre, puis celle-ci a été utilisée en tant que facteur de correction pour l'ensemble des protéines de l'échantillon. Cela permet d'avoir des données quantitatives comparables entre les échantillons.

2.1.3 Tests statistiques sur les protéines identifiées

Chaque protéine a été analysée statistiquement de manière indépendante. Afin de déterminer si une protéine a varié de manière statistiquement significative, le test non-paramétrique des rangs signés de Wilcoxon a été employé avec un p bilatéral $< 0,05$. Ce test a été choisi pour de nombreuses raisons : les quantités avant/après traitement de chaque protéine sont des variables dépendantes (pairees), le nombre de paires de données était faible ($n = 15$) et la répartition des données ne suivait pas une distribution normale. Étant donné le petit nombre d'échantillons, nous avons décidé de ne pas appliquer de facteur d'ajustement de Bonferroni lors de l'analyse statistique de nos résultats, puisqu'un tel ajustement aurait produit un nombre trop important d'erreurs de type II en raison de la faible puissance de notre étude. L'utilisation d'une correction de Bonferroni (*i.e.* la division du seuil alpha par le nombre d'analyses effectuées) aurait selon nous été inappropriée, étant donné le caractère exploratoire de nos analyses protéomiques. Une telle correction n'aurait pas permis de reconnaître les variations de certains biomarqueurs potentiels.

Un calcul du FDR a également été effectué pour déterminer le nombre de protéines pouvant être identifiées selon le fruit du hasard parmi notre liste. Le FDR a été calculé en multipliant le risque d'erreur alpha (alpha bilatéral = 0,05) avec le nombre de protéines ayant été analysées statistiquement ($n = 1169$).

2.1.4 Analyses Panther des protéines obtenues

Afin d'étudier les caractéristiques générales du protéome des plaquettes, les protéines les plus abondantes dans l'échantillon pré-traitement du participant #10 (10V0)

ont été analysées avec le logiciel *Panther* (version 10.0, utilisé en ligne le 2016/10/16 à l'adresse <http://www.pantherdb.org>). Cet échantillon (10V0) a été choisi car ses caractéristiques étaient similaires à celles des autres spécimens. Ainsi, le nombre de protéines identifiées dans cet échantillon correspondait à la médiane pour l'ensemble des analyses. Lors des analyses *Panther*, les 252 protéines les plus abondantes représentant 75% du spectre MS/MS de cet échantillon ont été classifiées selon leur fonction moléculaire, les processus biologiques dans lesquels elles sont impliquées et les voies signalétiques/métaboliques dans lesquelles elles sont impliquées. Le système de classification *Panther* (*Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships*) a été conçu pour permettre l'analyse d'un grand nombre de protéines. Il s'agit du fruit d'algorithmes bioinformatiques complexes détaillés dans la littérature (Mi *et al.*, 2012; Thomas, 2003).

2.2 Méthodologie de l'étude clinique LovaC

L'étude clinique LovaC a permis d'administrer de la lovastatine à 15 individus en bonne santé et à recueillir des échantillons de plaquettes sanguines chez ceux-ci. Les détails méthodologiques de cette étude sont ici présentés.

2.2.1 Devis de recherche

Pour répondre à nos objectifs, nous avons réalisé une étude pré-expérimentale ouverte, non-randomisée, qui évalue l'effet d'une administration de lovastatine pendant six semaines sur le protéome d'individus sains (une étude avant/après). Puisqu'il s'agit d'une étude clinique, nous présentons ci-dessous dans la section 2.2.2 les caractéristiques du médicament administré (Apotex Inc., 2014; « Lovastatin: Drug information - UpToDate », s. d.; Sandoz Canada Inc., 2014).

2.2.2 Médicament administré : la lovastatine

Origine et caractéristiques chimiques :

La lovastatine est une substance hypocholestérolémiante. Elle est ingérée en tant que lactone inactive, puis elle est hydrolysée sous forme d'acide β -hydroxylé qui représente sa forme active.

- Nom propre : lovastatine

- Nom chimique (IUPAC) : (1*S*,3*R*,7*S*,8*S*,8*aR*)-8-{2-[(2*R*,4*R*)-4-hydroxy-6-oxooxan-2-yl]ethyl}-3,7-dimethyl-1,2,3,7,8,8*a*-hexahydronaphthalen-1-yl (2*S*)-2-methylbutanoate
- Formule moléculaire : C₂₄H₃₆O₅
- Masse moléculaire : 404.55 g/mole

Pharmacodynamie :

La lovastatine réduit la production de cholestérol par le foie et provoque certaines modifications dans le transport et la distribution du cholestérol dans le sang et les tissus. Les mécanismes qui commandent cet effet semblent entraîner à la fois une réduction de la synthèse des lipoprotéines de basse densité (LDL) et une augmentation du catabolisme des LDL en réponse à un accroissement du nombre des récepteurs hépatiques des LDL.

Métabolisme :

La lovastatine est métabolisée par les enzymes hépatiques microsomales (isoforme 3A4 du cytochrome P450). Les principaux métabolites actifs de la lovastatine retrouvés dans le plasma humain sont l'acide β-hydroxylé et les dérivés 6-hydroxylé, 6-hydroxyméthylé et 6-exométhylène.

Régime posologique :

La dose utilisée en clinique varie entre 20 et 80 mg par jour, pris en dose unique. Dans l'étude LovaC, une dose de 40 mg par jour est administrée pendant 6 semaines, tout en s'assurant que le médicament est bien toléré.

Indications reconnues par Santé Canada :

- Traitement des hypercholestérolémies primaire ou secondaire
- Prévention primaire ou secondaire des maladies cardiovasculaires

Contre-indications :

- Hypersensibilité à ce médicament ou à l'un des composants du produit.
- Affection hépatique évolutive ou élévation persistante et inexplicquée des

transaminases sériques.

- Grossesse ou allaitement.
- Myopathie, myalgie ou histoire de CK élevées
- Pathologie rénale ou bilan rénal perturbé

Interactions alimentaires et médicamenteuses :

- Lors de l'administration de la lovastatine, les participants de l'étude sont avisés de ne pas consommer de jus de pamplemousse, puisque cet aliment a la capacité d'inhiber l'isoforme 3A4 du cytochrome P450. La consommation de pamplemousse peut inhiber l'élimination de la lovastatine et résulter en une élévation dangereuse de son taux sérique.
- L'association de la lovastatine avec d'autres régulateurs du métabolisme lipidique comme le gemfibrozil, les autres fibrates et la niacine utilisée à des doses hypolipémiantes peuvent accroître le risque de myopathie lorsqu'ils sont administrés conjointement avec un inhibiteur de l'HMG-CoA réductase.
- L'emploi concomitant d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA) augmente le risque d'hyperkaliémie associée à une myosite (myalgies et hausse des CK à plus de 10 fois la limite normale supérieure).
- Lorsque pris avec la lovastatine, la cyclosporine, le danazol, l'amiodarone et le vérapamil, augmentent le risque de myopathie et de rhabdomyolyse.
- La lovastatine est un substrat du CYP3A4. Par conséquent, chez les patients traités avec la lovastatine, le risque de myopathie peut être augmenté par la prise des inhibiteurs puissants du CYP3A4. Ces substances sont l'itraconazole, le kétoconazole, l'érythromycine, la clarithromycine, la télichromycine, les inhibiteurs de la protéase utilisés chez les séropositifs VIH et la néfazodone.

Les effets indésirables connus :

Ceux-ci sont résumés dans le tableau 7 ci-dessous, inspiré des résultats de l'étude EXCEL (Bradford, 1991).

Tableau 7 : Effets indésirables connus de la lovastatine

État général	Asthénie
Système musculo-squelettique	Myalgies Myosite Rhabdomyolyse (très rare)
État neuropsychiatrique	Étourdissements Céphalées Dépression Vision embrouillée
Système gastro-intestinal	Douleurs abdominales/épigastriques Constipation Diarrhée Dyspepsie Flatulences Nausées
Système tégumentaire	Éruptions cutanées

2.2.3 Population à l'étude et échantillon

Les hommes et les femmes de 18 à 40 ans en bonne santé ont été la population cible de notre étude. Autant que possible, les individus ont été recrutés afin que leurs données démographiques concordent avec les données démographiques des individus SXF ayant participé à l'étude LovaX (majorité de jeunes hommes). Un échantillonnage de convenance a été réalisé. Aucune randomisation des participants n'a été effectuée, puisque notre devis pré-expérimental n'employait pas de groupe de comparaison.

Critères d'inclusions :

- Homme ou femme.
- Âge entre 18 et 40 ans.
- Être apte à consentir pour participer à une étude clinique.
- Les patientes qui sont susceptibles de devenir enceintes et qui ont des relations sexuelles doivent employer une méthode de contraception hautement efficace et une

méthode efficace pendant l'essai clinique, et pendant au moins trois mois après la fin de la prise du médicament à l'étude.

- Parmi les méthodes hautement efficaces figurent notamment : les contraceptifs hormonaux (ex : les contraceptifs oraux combinés, le timbre contraceptif, l'anneau vaginal, les produits injectables et les implants); les dispositifs intra-utérins ou les systèmes intra-utérins ; la vasectomie et la ligature des trompes.
- Parmi les méthodes efficaces, on peut compter les méthodes contraceptives de barrière (ex : le condom masculin, le condom féminin, la cape cervicale, le diaphragme, l'éponge contraceptive).

Critères d'exclusion :

- Patients avec dyslipidémie connue OU suggérée par les tests de laboratoire effectués à la visite de recrutement (V0). Nous avons aussi exclu tout individu ne se retrouvant pas entre le 5^e et le 95^e percentile pour les valeurs de LDL ou C-Total ou HDL.
- Patients présentant une hypersensibilité à ce médicament ou à l'un des composants du produit.
- Avoir un diagnostic moléculaire positif (documenté par Southern blot et/ou PCR) pour le syndrome du X fragile.
- Grossesse ou allaitement.
- Intolérance antérieure aux statines.
- Consommation excessive d'alcool.
- Myopathie ou myalgie ou histoire de CK élevées.
- Antécédents personnels ou familiaux de troubles musculaires héréditaires.
- Exercices physiques intenses.
- Pathologie rénale ou hépatique ou bilan hépatorénal perturbé.
- Utilisation concomitante des médicaments suivants : tout hypolipémiant, inhibiteurs du cytochrome CYP3A4 (ex : itraconazole, ketoconazole, posaconazole, voriconazole, inhibiteurs de protéase du VIH, boceprevir, telaprevir, erythromycin, clarithromycin, telithromycin, nefazodone et produits contenant du cobicistat), IECA, danazol, verapamil, diltiazem, cyclosporine, amiodarone, colchicine et acide

fusidique (IV ou oral).

- Hypothyroïdie connue.
- Toute autre condition médicale aiguë.
- Interventions chirurgicales immédiatement avant ou pendant l'étude clinique.

Taille de l'échantillon :

Puisqu'aucune donnée n'est disponible au sujet de l'écart-type et de la moyenne pour chaque quantité de protéine dans les plaquettes sanguines, nous avons effectué un échantillon de convenance et avons recruté 18 participants.

Cette taille d'échantillon a été choisie en vertu de deux raisons. Premièrement, nous désirions recruter un nombre de participants similaire à l'étude LovaX (15 patients avaient alors été recrutés). Deuxièmement, des contraintes budgétaires et temporelles ne nous permettaient pas de recruter un nombre supérieur de participants.

Exclusion des sujets pendant l'étude :

Plusieurs circonstances auraient pu conduire à l'exclusion de sujets durant l'étude. Nous avons anticipé peu d'abandons au cours de l'étude, puisque la durée de celle-ci était courte, que le nombre de visites était limité et que la prise du médicament était facile (petit comprimé à consommer une fois par jour). Les participants ont en tout temps pu se retirer de l'étude et s'ils le désiraient, communiquer les raisons de leur retrait.

L'effet de la lovastatine n'a jamais été étudié durant la grossesse. Afin d'éviter tout effet tératogène possiblement relié au traitement, les participantes ont passé des tests de grossesse (test qualitatif très sensible et spécifique par dosage sérique d'hCG). Il était prévu que les participantes recevant un résultat positif soient retirées de l'étude et référées à leur médecin de famille ou à un autre médecin obstétricien. Les méthodes contraceptives recommandées durant l'étude sont décrites ci-dessus. Les méthodes acceptables de contraception dans le protocole et le formulaire de consentement étaient en accord avec le document d'orientation : « Considérations relatives à l'inclusion des femmes dans les essais cliniques et à l'analyse des données selon le sexe, Annexe A : Considérations relatives à l'utilisation de contraceptifs dans le cadre d'essais cliniques, le 29 mai 2013. »

Tous les effets indésirables persistants rapportés au cours de chaque rencontre ou au suivi téléphonique ont été pris en considération et auraient pu entraîner un arrêt immédiat de la médication. Les patients ont été suivis de près jusqu'à la résolution de leurs symptômes, ou jusqu'à l'amélioration de leur bilan sanguin (voir section 2.2.6).

Il était prévu qu'une interruption de lovastatine pendant sept jours consécutifs entraînerait automatiquement le retrait du participant de l'étude.

Il a été demandé que les participants nous avisent en cas d'oubli de doses ou s'ils désiraient prendre un médicament ne faisant pas partie de leur liste au moment du recrutement (qu'il soit sous prescription ou non). Parmi les médicaments particulièrement contre-indiqués, mentionnons ceux-ci : le gemfibrozil (ou autres fibrates), la niacine (acide nicotinique), les IECA (inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine), la cyclosporine, le danazol, l'amiodarone, le vérapamil et les inhibiteurs du cytochrome P450 (CYP3A4) (l'itraconazole, le kétoconazole, l'érythromycine, la clarithromycine, la télichromycine, les inhibiteurs de la protéase du VIH et la néfazodone).

Au début de l'étude, toutes les circonstances possibles pouvant conduire à une exclusion ont été discutées avec les participants et ont figuré dans le formulaire de consentement.

2.2.4 Recrutement

Les individus pouvant potentiellement participer à l'étude ont été sollicités par des affiches publicitaires exposées dans les couloirs du CHUS. De plus, nous avons compté sur le bouche-à-oreille parmi nos cercles d'amis et de collègues afin d'atteindre le nombre désiré de sujets pour notre étude. Les sujets intéressés ont été invités à communiquer par courriel avec Dr François Corbin (investigateur principal) afin de planifier une rencontre de pré-recrutement au centre de recherche du CHUS. Dr François Corbin ou Mathieu Fradet ont expliqué le projet aux individus. Lors de cette visite, Dr Corbin et Mathieu Fradet ont obtenu le consentement libre et éclairé des participants après que ceux-ci aient eu réponse à leurs interrogations. Enfin, une copie signée du formulaire de consentement a été donnée au participant pour ses documents personnels. Une autre copie signée du formulaire de consentement a été archivée dans une armoire sécurisée au CR-CHUS. En cas de refus de

participation à l'étude, les patients auraient pu, s'ils le désiraient, fournir la raison de leur refus sans que de nouvelles tentatives de recrutement aient lieu.

2.2.5 Déroulement de l'étude

Le tableau 8 présente un résumé du déroulement de l'étude LovaC. Les fiches remplies lors de chaque visite ainsi que les formulaires de consentement signés, sont gardés sous clef dans le dossier de recherche des participants au CR-CHUS.

Tableau 8 : Calendrier des rencontres pour l'étude LovaC

CALENDRIER DES RENCONTRES					
Phase de l'étude	Consentement	Traitement (8 semaines)			Post - traitement
Médicament et posologie	Nil	Lovastatine 40 mg			Nil
No de la visite	0	1	Tel 1	2	Tel 2
Semaine	-2	0	2	6	8
Vérification des critères d'inclusion/exclusion ou de retrait	X	X	X		
Prélèvement sanguin pour analyse protéomique	X	X		X	
Histoire et examen physique	X	X		X	
Effets adverses			X	X	X
Observance au traitement			X	X	
Tests sanguins (bilan)	X			X	

Visite de consentement (Visite 0) :

Pour les individus intéressés à participer au projet de recherche, une visite de recrutement a été planifiée au CR-CHUS. Lors de ce rendez-vous, l'un des investigateurs (Dr Corbin ou Mathieu Fradet) a obtenu un consentement libre et éclairé, ainsi que la signature du formulaire de consentement (comme décrit dans la section 2.2.4), et a fait une anamnèse complète du participant comprenant les antécédents médico-chirurgicaux, la prise de médicaments/produits naturels au cours des six dernières semaines, les habitudes de vie et l'histoire actuelle, suivi par un examen physique complet (pouls, pression artérielle, température, poids, taille et tour de taille, l'apparence générale, la peau, la sphère ORL, la

thyroïde, les poumons, le cœur, l'abdomen, les ganglions, les extrémités, la vascularisation périphérique, ainsi qu'un examen neurologique sommaire).

Les participants ont eu leur premier prélèvement sanguin comprenant ;

- Un tube lavande de 4 mL pour la FSC
- Un tube avec gel vert pâle de 4 mL pour C-Total, triglycérides, LDL, HDL, ApoB, glucose, créatinine (eGFR), ALT, CK et hCG (au besoin chez les femmes seulement)
- Trois tubes EDTA de 4 mL pour purification des plaquettes et analyse du protéome plaquettaire.

Il est à noter que les participants ont dû être à jeun lors de cette prise de sang. Pour cela, ils n'ont pas pu ingérer autre chose que de l'eau durant les douze heures précédentes. Ils ont dû s'abstenir de consommer de l'alcool durant les 48 heures précédant la visite et ils n'ont pas pu consommer de gomme à mâcher ou faire usage de produits du tabac le matin de cette rencontre.

Le temps alloué pour chacune de ces étapes est estimé dans le tableau 9 ci-dessous :

Tableau 9 : Temps alloué aux éléments de la rencontre V0

	Durée de chaque étape (min)	
	Avant enrôlement	Après enrôlement
Vérification des critères d'inclusion/exclusion	5	
Obtention du formulaire de consentement signé	10	
Évaluation clinique Anamnèse Signes vitaux Examen physique		15
Prise de sang		5

S'il est déterminé à l'examen des résultats de la prise de sang (prélevé à la visite 0) que le participant n'est pas éligible à l'étude selon tous les critères d'inclusions/exclusions, l'individu est contacté par notre équipe de recherche (Dr Corbin ou Mathieu Fradet), puis reçoit les explications nécessaires et un suivi médical approprié. À l'aide du bilan lipidique mesuré à la visite V0 ainsi qu'avec les informations cliniques obtenues en questionnant le

patient, le Score de risque Framingham (mesure du risque cardio-vasculaire) est calculé pour tous les individus ayant fourni leur consentement à l'étude. Si leur score de risque cardio-vasculaire est « modéré » ou supérieur à « modéré », l'individu en est averti par téléphone et un suivi médical approprié lui est offert.

Visite 1 :

La première visite de traitement (V1) est planifiée environ deux semaines après la visite de consentement. Au cours de cette visite, un questionnaire sur l'état de santé actuel du participant et une prise des signes vitaux sont faits. Le participant complète également le questionnaire pré-traitement portant sur l'âge, le sexe, l'origine ethnique, l'état de santé, la médication et l'alimentation.

On procède à une nouvelle vérification des critères d'inclusion et d'exclusion, puis les participants satisfaisant aux critères d'admission reçoivent la lovastatine. Nous avons distribué les comprimés de lovastatine 40 mg aux participants tout en leur expliquant la posologie et la voie d'administration, les effets indésirables connus, la conduite à tenir lors de la survenue de ces derniers et l'importance de la bonne observance au traitement. Les participants reçoivent ainsi une boîte de 50 comprimés de lovastatine 40 mg, avec une étiquette de posologie apposée sur la boîte, ainsi que les numéros de téléphone et de téléavertisseur de Dr Corbin et Mathieu Fradet (à contacter au besoin). Les participants reçoivent également une « Carte de renseignements du participant » sur laquelle figurent ces mêmes numéros de téléphone ainsi qu'une note indiquant que le participant consomme de la lovastatine pour les fins de la présente étude. Les participants sont avisés de conserver la « Carte de renseignements du participant » avec eux en tout temps. Également, les participants reçoivent un « Carnet de doses » dans lequel ils doivent noter la date et l'heure précise où ils ont pris le médicament.

Enfin, une ponction veineuse (trois tubes EDTA de 4 mL) est effectuée au centre de prélèvements, pour une deuxième analyse du protéome plaquettaire des individus participants et pour un dosage du hCG sérique (test de grossesse seulement si nécessaire). Il est à noter une fois de plus que les participants doivent être à jeun lors de cette prise de sang (tel que décrit précédemment).

Le temps alloué pour chacune de ces étapes est estimé dans le tableau 10 ci-dessous :

Tableau 10 : Temps alloué aux éléments de la rencontre V1

	Durée de chaque étape (min)
Vérification des critères d'inclusion/exclusion	5
Évaluation clinique Anamnèse Signes vitaux	5
Prise de sang	5
Distribution du médicament et counseling par rapport au traitement	10
Questionnaire écrit pré-traitement	2

Suivi téléphonique 1 :

Un premier suivi téléphonique sera planifié deux semaines après la visite 1. Ce suivi est fait par Dr Corbin ou Mathieu Fradet auprès des participants afin d'évaluer les effets indésirables et l'observance au traitement, tout en répondant à leurs questions ou inquiétudes. Nous rappellerons également aux participants qu'ils doivent nous rapporter les comprimés de lovastatine qu'ils n'auront pas consommés à la visite suivante.

Visite 2 :

La deuxième visite est planifiée six semaines après la visite 1. Au cours de cette rencontre, les investigateurs (Dr Corbin ou Mathieu Fradet) administrent un questionnaire afin de noter l'état clinique des participants et pour objectiver de possibles effets indésirables (voir ci-dessus pour la liste d'effets secondaires connus). L'observance est vérifiée en faisant le décompte des comprimés restants et en recueillant le « Carnet des doses ». Le patient doit remplir le questionnaire post-traitement portant sur l'âge, le sexe, l'état de santé et les effets indésirables, la médication et l'alimentation.

Le participant effectue un troisième prélèvement sanguin :

- Un tube avec gel vert pâle de 4 mL pour C-Total, triglycérides, LDL, HDL, ApoB, ALT, CK et au besoin, hCG (au besoin chez les femmes seulement)
- Trois tubes EDTA de 4 mL pour purification des plaquettes et analyse du protéome plaquettaire.

Tel que noté précédemment, les participants doivent être à jeun lors de cette autre prise de sang (tel que décrit précédemment). Les bilans sanguins sont ensuite vérifiés par Dr Corbin ou Dr Jean Dubé.

Tableau 11 : Temps alloué aux éléments de la rencontre V2

	Durée de chaque étape (min)
Évaluation clinique Anamnèse Effets secondaires Signes vitaux Examen physique	15
Vérification de l'observance	5
Prise de sang	5
Questionnaire post-traitement	5

Deuxième suivi téléphonique :

Un dernier suivi téléphonique est fait deux semaines après la dernière visite afin d'évaluer si des effets indésirables sont apparus après l'arrêt de la lovastatine. Au besoin, on vérifie également que les effets indésirables liés à la prise du traitement sont bien résolus.

2.2.6 Gestion des effets indésirables

Gestion des effets indésirables reliés au prélèvement :

Bien que les prises de sang ne causent pas de problèmes graves pour la plupart des gens, elles peuvent entraîner un petit écoulement sanguin après le retrait de l'aiguille, un léger malaise sous forme d'étourdissement ou un petit hématome local. Pour minimiser ces désagréments, les individus sont assis pendant le prélèvement et pour cinq minutes après celui-ci. Les prélèvements sanguins sont réalisés par une infirmière qualifiée du centre de prélèvements afin de minimiser les désagréments énumérés ci-dessus.

Gestion des effets indésirables reliés à la lovastatine :

L'information concernant les effets secondaires (tableau 7) se retrouve dans la monographie de produit (Apotex Inc., 2014). Cette information est incluse dans le formulaire de consentement et est discutée avec le participant.

Pendant l'étude, le participant peut contacter à tout moment les membres de notre équipe de recherche. Chaque effet indésirable est traité à l'aide d'un suivi médical approprié. Au besoin, des visites supplémentaires peuvent être planifiées afin d'assurer une bonne gestion des effets secondaires. Les effets indésirables et les interventions faites sont documentés. Au besoin, une déclaration des effets indésirables est transmise à Santé Canada et au comité d'éthique du CHUS.

2.2.7 Gestion du médicament (lovastatine)

L'investigateur principal délègue la gestion du produit pharmaceutique à la pharmacie du CR-CHUS afin d'uniformiser les procédures et la documentation reliées au produit de recherche. La pharmacie se charge de l'approvisionnement du médicament, de son entreposage, de son étiquetage (le nom/la marque de la lovastatine, numéro de lot, conditions de conservation, date d'expiration, le nom/l'adresse de l'investigateur Dr Corbin, le code du participant) de sa préparation et de sa distribution. La personne responsable procède en respectant les politiques en vigueur de la pharmacie du CR-CHUS.

2.2.8 Variables cliniques recueillies

Variables d'innocuité et d'effets de la lovastatine

Un effet indésirable désigne toute apparition ou aggravation d'un symptôme, signe ou condition médicale, associé dans le temps au traitement de recherche. Un résultat anormal d'analyse de laboratoire est considéré comme un effet secondaire seulement lorsqu'il induit des symptômes ou des signes cliniques significatifs nécessitant ou non un traitement.

Le terme « effet indésirable grave » désigne toute manifestation médicale qui : entraîne le décès du sujet, met sa vie en danger, nécessite son hospitalisation ou la prolongation de son hospitalisation, entraîne une invalidité/incapacité permanente ou importante, ou se traduit par une anomalie/malformation congénitale.

Tout effet indésirable référencé connu (présenté dans le tableau 7) ou inconnu auparavant, est documenté selon sa sévérité (légère, modérée ou sévère), son lien de causalité avec la lovastatine, sa date de survenue et sa durée.

Analyses de laboratoire testant l'innocuité de la lovastatine

Dans le cadre de notre étude, des analyses sont faites au laboratoire de biochimie et d'hématologie du CHUS-Fleurimont. Un bilan de base (FSC, hCG, bilan lipidique, glucose, créatinine, ALT et CK) est fait lors de la visite de recrutement, afin d'identifier les individus éligibles à l'étude. Par la suite, le même bilan est fait lors de la visite de suivi, afin de surveiller l'innocuité de la lovastatine.

Tableau 12 : Instrument de mesure des variables d'innocuité et d'effets de la lovastatine

Instrument	Variable	Mesure
Évaluation clinique (symptômes/signes)	Effets indésirables par système	Nombre de sujets Relation avec la lovastatine (non liée à fortement liée) Sévérité (de légère à sévère)
Analyses de laboratoire	Bilan lipidique Cholestérol total Triglycérides HDL LDL ApoB Bilan hépatique ALT Enzymes musculaires CK	Variation absolue et pourcentage de variation

Variables d'observance au traitement

Pour évaluer l'observance au traitement, un décompte des comprimés est effectué lors de la visite de suivi. Aussi, nous recueillons le « Carnet de doses » des participants dans lequel ils ont été avisés de noter les moments où ils consomment la lovastatine ou tout autre médicament. Pour chaque participant, le pourcentage d'observance a été déterminé en

divisant le nombre de jours où la lovastatine a été consommée (en terminant à la visite V2) par le nombre de jours écoulés depuis le début de la prise du médicament (commençant à la visite V1).

2.2.9 Analyse des données cliniques

Une analyse descriptive appropriée est faite pour chaque donnée clinique recueillie, catégorique ou continue.

Tableau 13 : Données de base recueillies sur les participants de l'étude LovaC

Donnée	Type de donnée	Échelle de mesure
Âge	Continue	Médiane \pm écart interquartile
Sexe	Catégorique	Fréquence, pourcentage
Origine ethnique	Catégorique	Fréquence, pourcentage
Indice de masse corporelle (IMC)	Continue	Médiane \pm écart interquartile
Tour de taille	Continue	Médiane \pm écart interquartile
Consommation de médicaments durant l'étude	Catégorique	Fréquence, pourcentage
État général de santé des participants	Catégorique	Fréquence, pourcentage
Suivi d'un régime alimentaire particulier	Catégorique	Fréquence, pourcentage
Tabagisme actif	Catégorique	Fréquence, pourcentage
Consommation occasionnelle de cannabis	Catégorique	Fréquence, pourcentage
Sédentarité	Catégorique	Fréquence, pourcentage

La recension des effets secondaires de la lovastatine est faite par une analyse descriptive appropriée. Pour chaque effet indésirable, il est nécessaire de déterminer le nombre d'évènements, le nombre de sujets atteints et la sévérité. Nous estimerons également la probabilité de relation causale avec la lovastatine (pas de cause iatrogénique plausible, possible origine iatrogénique, probablement causée par la prise du médicament).

La méthodologie relative à la préparation et l'analyse protéomique des échantillons de plaquettes d'individus sains est décrite de manière détaillée à la section 2.3.

2.2.10 Considérations éthiques

Approbation du projet par les instances réglementaires :

Avant de débiter notre étude clinique, une approbation de notre protocole a été obtenue auprès de Santé Canada, du comité scientifique du CHUS et du comité d'éthique du CHUS. De plus, notre étude clinique a été enregistrée sur le site ClinicalTrials.gov sous l'identifiant NCT02389868.

Gestion de la confidentialité :

Les dossiers papiers incluant les informations nominatives, les formulaires de consentement, les caractéristiques des patients (âge, sexe, etc) et les résultats d'analyses sanguines sont gardés confidentiellement et sous clef au CR-CHUS. Tous les participants de recherche sont identifiés par un code. Une feuille de codes, permettant de relier le code de l'individu avec ses données nominatives, est gardée confidentiellement par l'investigateur principal. Aucune information permettant d'identifier les participants de recherche n'est publiée ou rendue accessible au public.

Effets indésirables possibles découlant de la participation à l'étude :

Tel que mentionné dans la section 2.2.6 et dans notre formulaire de consentement, les participants peuvent encourir certains risques, comme subir un léger préjudice physique relié aux prises de sang (et aux jeûnes les précédant) ou être exposés aux effets indésirables reliés à la lovastatine. La participation à la présente étude peut comporter des risques, connus ou non, pour les femmes enceintes, les embryons, les fœtus ou encore les nourrissons allaités au sein. C'est pourquoi les femmes enceintes ou qui allaitent n'ont pas pu participer à ce projet. Les femmes susceptibles de devenir enceintes ont dû subir un test de grossesse avant le début de leur participation au projet ainsi qu'à chaque visite. De plus, elles doivent absolument utiliser des méthodes contraceptives acceptables (décrites à la section 2.2.3) tout au long de leur participation au projet de recherche et jusqu'à trois mois après la fin de l'étude.

Bénéfices possibles de la participation à l'étude :

Les participants peuvent bénéficier de la valorisation psychologique d'avoir contribué à l'avancement de la science. En effet, les objectifs de l'étude sont clairement expliqués avant d'obtenir le consentement des participants et ceux-ci sont en mesure d'apprécier l'ampleur de leur contribution pour la recherche sur le SXF. De plus, l'information recueillie quant à la variabilité du protéome plaquettaire ouvre la voie vers l'utilisation de ce modèle cellulaire pour l'étude d'une multitude d'autres maladies du système nerveux central. Finalement, notons que les participants de l'étude peuvent bénéficier du bilan médical (questionnaire, revue des systèmes et bilan de base) qui leur est offert à la visite V0.

Consentement éclairé écrit :

Le formulaire de consentement, rédigé en des termes simples, est remis aux participants potentiels. Dans le formulaire de consentement, le rôle des sujets de recherche est expliqué en détail et tous les éléments utiles à la compréhension du projet de recherche et à la prise d'une décision éclairée sont décrits. Dr Corbin et Mathieu Fradet s'assurent de la bonne compréhension du projet par les sujets et répondent à leurs interrogations. Ces personnes possèdent les connaissances et les qualifications requises afin de leur fournir tous les renseignements nécessaires concernant le projet de recherche. Aucune pression n'est exercée sur eux et le fait de ne pas participer n'a aucun impact négatif. De plus, il est mentionné clairement que les participants peuvent se retirer de l'étude à tout moment, et ce, sans subir de préjudice.

Compensation financière :

À chaque visite, un montant de 10\$ sera prévu pour défrayer le stationnement ou le transport du participant. De ce fait, le montant maximal pouvant être alloué à un participant durant la totalité de l'étude est d'une valeur de 30\$. Un coupon de repas valide à la cafétéria du CHUS est également offert à chaque visite.

2.3 Préparation de lysats plaquettaires d'individus sains (étude LovaC)

Le sang des participants a été récolté par ponction au centre de prélèvements du CHUS dans des tubes K2 EDTA (*Becton-Dickinson*). Le contenu de 3 tubes a été transvidé dans des tubes Falcon 15 mL puis centrifugé à 350g pendant 10 minutes à température pièce. Le plasma riche en plaquettes (PRP) a été délicatement prélevé avec une pipette de transfert et mis dans un tube Falcon 15 mL. De l'EDTA 500mM a été ajouté à chaque tube de PRP afin d'obtenir une concentration finale de 5 mM. Un décompte cellulaire a été effectué sur 300 μ L de PRP à l'aide d'un appareil XE-5000 (Sysmex Inc.) au laboratoire d'hématologie du CHUS afin de déterminer le nombre de plaquettes, de globules blancs et d'érythrocytes par unité de PRP. Ensuite, un échantillon de PRP contenant 250×10^6 plaquettes a été centrifugé à 2400g pendant 15 minutes à température pièce afin d'obtenir un culot cellulaire. Le plasma pauvre en plaquette (surnageant) a été délicatement prélevé à l'aide d'une pipette Pasteur. Le culot de plaquettes a été resuspendu dans 14 mL de PBS + EDTA 5 mM. L'échantillon a de nouveau été centrifugé à 2400g pendant 15 minutes à température pièce, puis le surnageant a été récolté avec une pipette pasteur. Enfin, le culot de plaquettes lavées a été resuspendu dans 167 μ L de PBS + 83 μ L de SB 3X afin d'obtenir une solution finale de 200 μ L d'échantillon contenant 2% de SDS, 15% glycérol et du β -mercaptoéthanol. Afin d'achever la dénaturation des protéines, l'échantillon a été chauffé à 98°C pendant 8 minutes, et a été homogénéisé à l'aide d'une seringue et d'une aiguille de calibre 23. Enfin, les échantillons ont été entreposés à -80°C le plus rapidement possible.

2.4 Congélation de plaquettes sanguines entières

2.4.1 Protocole de congélation de plaquettes

Le sang des participants de l'étude LovaC a été prélevé par ponction veineuse dans des tubes K2 EDTA. Le PRP a été isolé tel que décrit à la section 2.3.1 en combinant le contenu de 2 tubes EDTA dans un même tube Falcon 15 mL, puis en centrifugeant le sang total à 350g à température pièce durant 10 minutes. Le PRP a été isolé avec pipette de transfert en faisant attention de ne pas suspendre les globules blancs et les érythrocytes. De l'EDTA 500mM pH 8,0 a été ajouté au PRP afin d'obtenir une concentration finale de 5mM. Le tube a été légèrement agité, puis 300 μ L de PRP ont été mis de côté afin de procéder à un décompte en hématologie. Du PGE1 (*Sigma Aldrich*) à 28,21 μ M a été ajouté au PRP (voir

protocole « *Préparation de PGE1* ») afin d'obtenir une concentration finale de 500nM PGE1, puis le tube a doucement été agité. Du DMSO 30% (3mL DMSO pur + 7mL NaCl 0,9%) a été ajouté au PRP au goutte-à-goutte afin d'obtenir une concentration finale de 6% DMSO. L'ajout du DMSO (*Sigma Aldrich*) a été lent afin d'éviter une précipitation des protéines plasmatiques. Le tube a été doucement agité, puis des aliquots contenant 250×10^6 plaquettes chacun ont été préparés dans des tubes vissés de 2 mL. Les échantillons ont finalement été rangés à -80°C le plus rapidement possible.

2.4.2 Protocole de vérification de l'intégrité des plaquettes sanguines après congélation

Afin de s'assurer que les plaquettes sanguines résistent au protocole de congélation décrit à la section 2.4.1, un décompte des plaquettes a été fait avec un appareil XE-5000 au laboratoire d'hématologie du CHUS avant la congélation, puis après qu'un échantillon ait passé 132 jours au congélateur à -80°C.

De plus, une quantification de FMRP a été effectuée par WB sur un échantillon de plaquettes tel que décrit par Lessard *et al.* (2012). Cette quantification a été faite sur un même échantillon avant congélation, puis après 17 jours passés au congélateur à -80°C. Une normalisation du signal de FMRP a été effectuée selon l'intensité du signal de la tubuline sur la membrane. Les membranes ont été imagées avec le système *Odyssey Infrared Imaging System* (*LI-COR Biosciences*) et l'intensité des bandes a été quantifiée avec le programme *Image Studio* (*LI-COR Biosciences*).

3. RÉSULTATS

3.1 Optimisation des techniques LC-MS/MS

La première analyse protéomique d'un échantillon de l'étude LovaX (effectuée après digestion sur gel et en une seule injection sur l'appareil LC-MS/MS) a permis d'identifier seulement 435 protéines. Parmi les protéines identifiées, de nombreuses composantes du cytosquelette étaient présentes en grande abondance, tel que la taline, l'actine et la filamine A. De plus, l'albumine (un contaminant issu du plasma) était également présente en grande quantité. Il est difficile d'éliminer la présence d'albumine dans nos échantillons, puisque cette protéine est présente en très grande concentration dans le plasma. De plus, il est impossible d'éliminer entièrement le plasma hors de nos échantillons, puisque les plaquettes ont une structure poreuse permettant au plasma de s'infiltrer dans leur système canaliculaire ouvert. Certaines protéines sont identifiées dans ces échantillons avec un nombre extrêmement élevé de peptides. Par exemple, tandis que 78% des protéines sont identifiées avec 10 peptides ou moins, la protéine Taline 1 est identifiée avec 250 peptides. La grande abondance de cette protéine masque le spectre MS/MS et empêche d'identifier des protéines moins abondantes dans l'échantillon.

Une coloration au bleu de Coomassie du gel de SDS-PAGE effectuée avant la digestion à la trypsine a révélé la présence de bandes très riches en protéines (voir figure 9). Tel que mentionné ci-dessus, nos premières analyses LC-MS/MS ont révélé que certaines protéines du cytosquelette étaient exprimées en grande abondance dans nos échantillons. Le poids moléculaire de ces protéines très abondantes du cytosquelette laisse croire qu'elles seraient en grande partie responsables de la coloration importante du gel dans certaines zones.

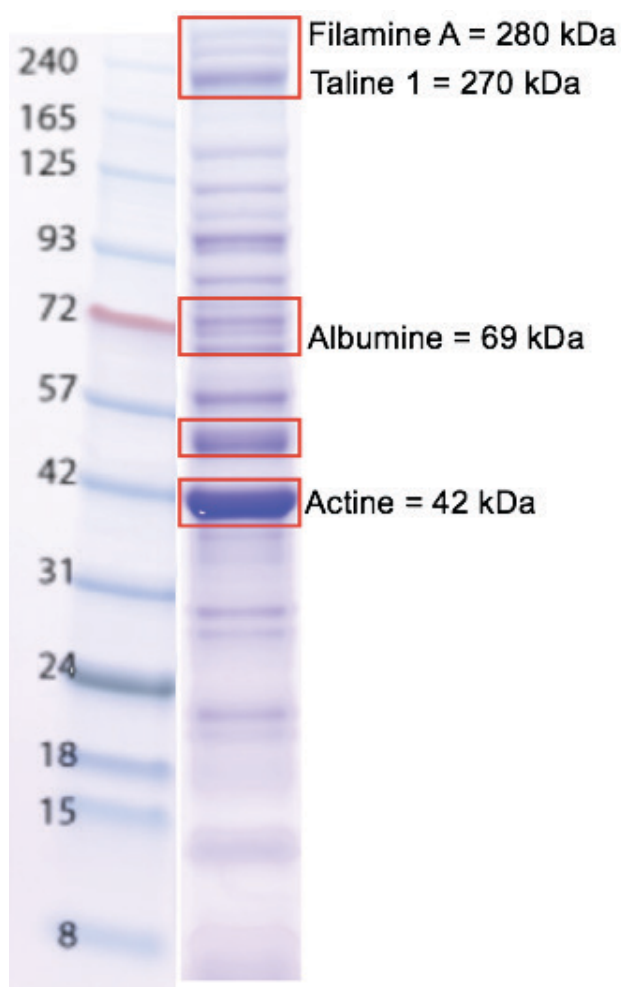


Figure 9 : Coloration au bleu de Coomassie révélant la présence de bandes très riches en protéines.

Ligne 1 : marqueurs de poids moléculaire.
Ligne 2 : extrait de protéines plaquettaires séparées par SDS-PAGE et coloré au bleu de Coomassie. Les zones de gel excisées lors des analyses subséquentes ont été encadrées sur la ligne 2. Le poids moléculaire de certaines protéines abondamment identifiées lors de nos premières analyses a été inscrit.

Tel que décrit à la section 2.1.2, les analyses protéomiques subséquentes ont été faites après excision de certaines bandes sur le gel SDS-PAGE (zones >170 kDa, 65-75 kDa, 50-55 kDa et 40-45 kDa). Ensuite, les échantillons de peptides ont été injectés en deux fractions séparées sur l'appareil LC-MS/MS. Les analyses subséquentes ont permis d'identifier un nombre significativement plus élevé de protéines. La médiane du nombre de protéines identifiées dans chaque échantillon est de 1250, ce qui correspond à une augmentation de 287% du nombre de protéines identifiées. De plus, l'abondance de l'albumine et de protéines du cytosquelette de moindre intérêt a été diminuée par l'excision des bandes sur le gel. Ceci concorde avec une diminution importante des protéines les plus abondantes. Le tableau 14 ci-dessous présente la réduction de certaines protéines de moindre intérêt.

Tableau 14 : Diminution de l'abondance de certaines protéines après excision des bandes sur le gel SDS-PAGE.

Protéine	Poids moléculaire théorique (kDa)	Pourcentage d'élimination
Albumine	69	89,1 %
Actine	42	81,0 %
Filamine A	280	61,8 %
Taline 1	270	54,3 %

3.2 Analyse globale du protéome plaquettaire

3.2.1 Analyse globale des protéines plaquettaires

Considérant l'ensemble des échantillons, l'analyse LC-MS/MS des échantillons de l'étude LovaX a permis d'identifier 1731 protéines distinctes. La figure 10 présente le nombre de protéines dans chaque échantillon avant et après traitement à la lovastatine.

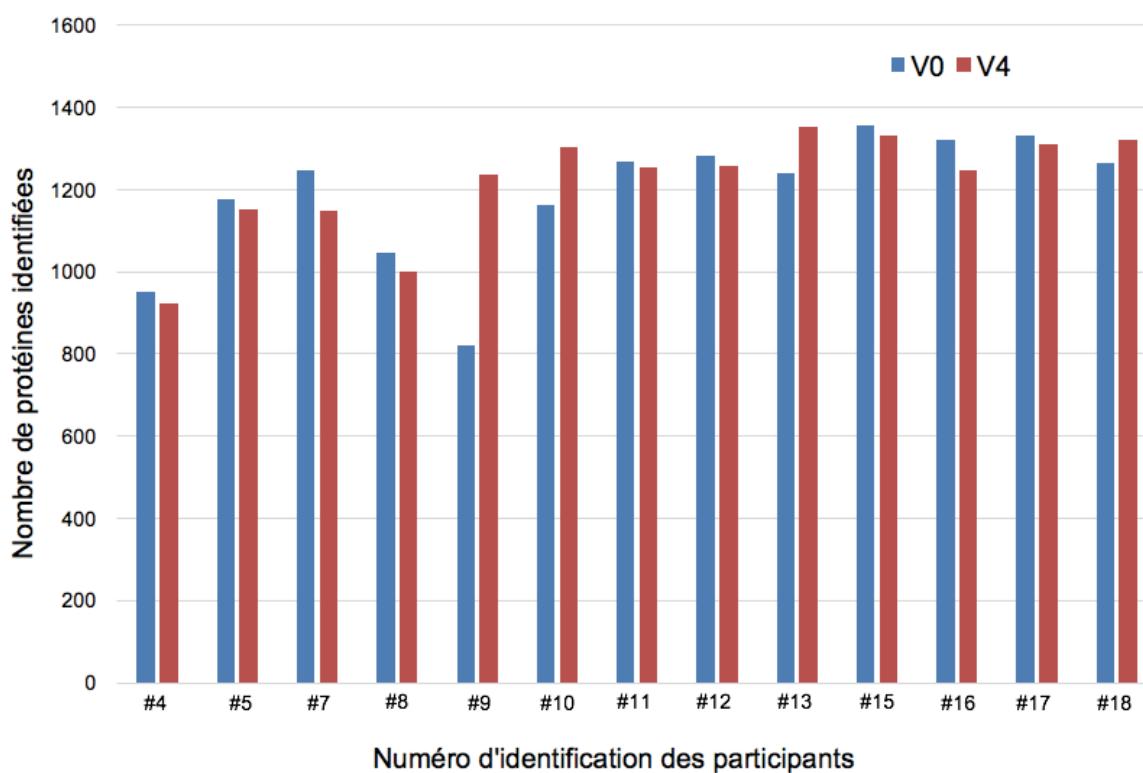


Figure 10 : Nombre de protéines identifiées dans chaque échantillon avant et après traitement chez les participants à l'étude LovaX. Les participants sont séparés sur l'axe des x selon leur ordre d'entrée dans l'étude. Il est à noter que certains numéros sont absents, puisqu'aucun échantillon n'était disponible pour ces participants.

Remarquons qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative dans le nombre de protéines identifiées avant et après traitement à la lovastatine (test des rangs signés de Wilcoxon, $p = 0,92$).

Enfin, dans chaque échantillon, environ 20% des protéines les plus abondantes représentent près de 75% de l'intensité totale du spectre MS/MS. Cela suggère que dans les plaquettes, un petit nombre de protéines est donc fortement exprimé, tandis que les autres protéines (plus nombreuses) sont exprimées en moins grande quantité.

3.2.2 Analyses *Panther* des protéines plaquettaires

Tel que décrit à la section 2.1.4, les analyses *Panther* ont été réalisées sur les 252 protéines les plus abondantes de l'échantillon pré-traitement du participant #10 de l'étude LovaX. Tel que noté à la section 2.1.4, cet échantillon a été choisi car son spectre LC-MS/MS ressemblait à celui des autres échantillons : le nombre de protéines identifiées dans cet échantillon correspondait à la médiane pour l'ensemble des analyses.

Les analyses *Panther* ont révélé que 23% des protéines les plus abondantes dans cet échantillon avaient une fonction dans le cytosquelette des cellules (voir figure 11). Parmi

elles, 38 appartiennent à la famille des microfilaments, neuf appartiennent à la famille des protéines des microtubules, et deux forment les filaments intermédiaires.

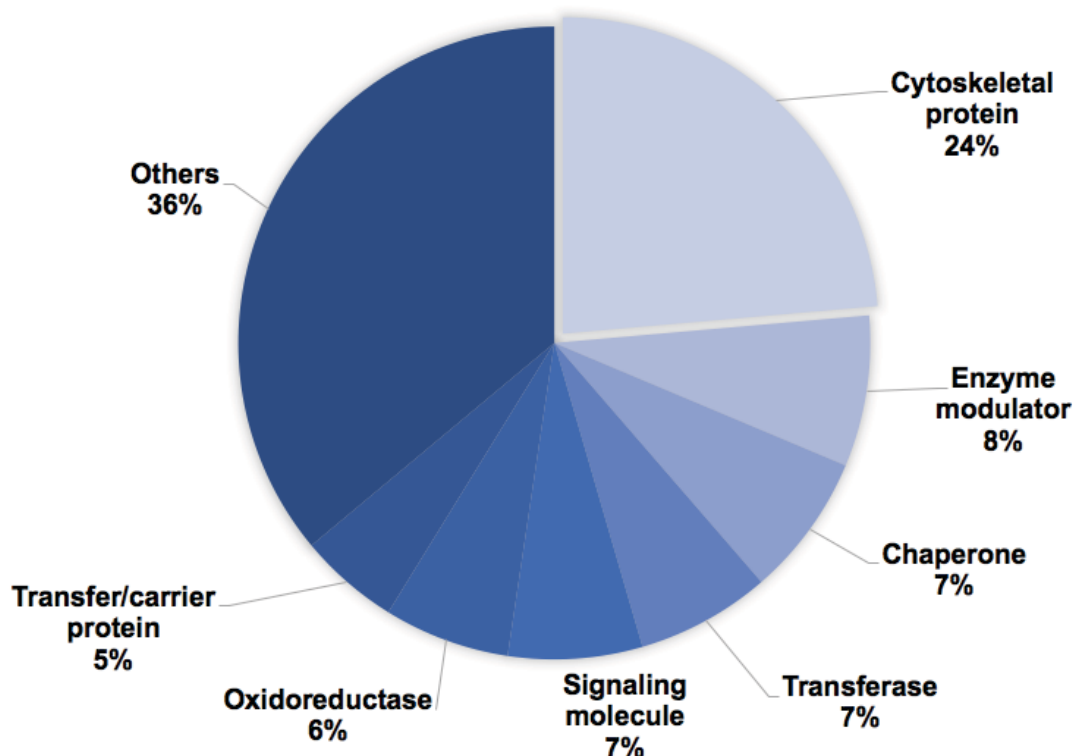


Figure 11 : Classes de protéines (selon la notation *Panther*) représentées parmi les 252 protéines les plus abondantes de l'échantillon 10V0. Bien qu'ils soient en langue anglaise, les termes *Panther* ont été employés dans cette figure afin d'éviter toute erreur de traduction.

Les analyses *Panther* ont également permis d'identifier des processus biologiques surreprésentés et sous-représentés dans nos échantillons (comparativement à un protéome cellulaire standard). Parmi les processus surreprésentés, on identifie notamment le transport médié par les vésicules, le transport des protéines, la morphogénèse de composés cellulaires et la biogenèse de composés cellulaires (voir tableau 15). Parmi les processus sous-représentés dans les plaquettes, on retrouve entre autres la transcription à partir de promoteurs d'ARN polymérase II, les processus métaboliques de l'ARN, la régulation de la transcription à partir de promoteurs d'ARN polymérase II, et la transcription ADN-dépendante (voir tableau 15).

Tableau 15 : Sélection de processus biologiques surreprésentés et sous-représentés selon le logiciel *Panther* parmi les protéines les plus abondantes de l'échantillon 10V0

<i>PANTHER GO-Slim Biological Process</i>	Facteur d'enrichissement	Valeur <i>p</i>
<i>Vesicle-mediated transport</i>	2,50	$2,37 \times 10^{-13}$
<i>Cellular component morphogenesis</i>	2,39	$1,04 \times 10^{-6}$
<i>Cellular component biogenesis</i>	2,17	$3,46 \times 10^{-4}$
<i>Transcription from RNA polymerase II promoter</i>	0,42	$2,49 \times 10^{-4}$
<i>RNA metabolic process</i>	0,39	$1,62 \times 10^{-9}$
<i>Regulation of transcription from RNA polymerase II promoter</i>	0,36	$2,47 \times 10^{-4}$
<i>Transcription, DNA-dependent</i>	0,35	$1,15 \times 10^{-7}$

Bien qu'ils soient en langue anglaise, les termes *Panther* ont été employés dans cette figure afin d'éviter toute erreur de traduction. Les valeurs *p* ici présentées sont générées par le logiciel *Panther* en comparant notre protéome expérimental à un protéome cellulaire standard.

Sans grande surprise, l'analyse *Panther* révèle également que la coagulation et la signalisation des intégrines sont des voies importantes où sont impliquées les protéines plaquettaires (voir figure 12). De plus, le protéome des plaquettes est riche en protéines impliquées dans la cascade RAS/MAPK/ERK et la glycolyse (voir figure 12).

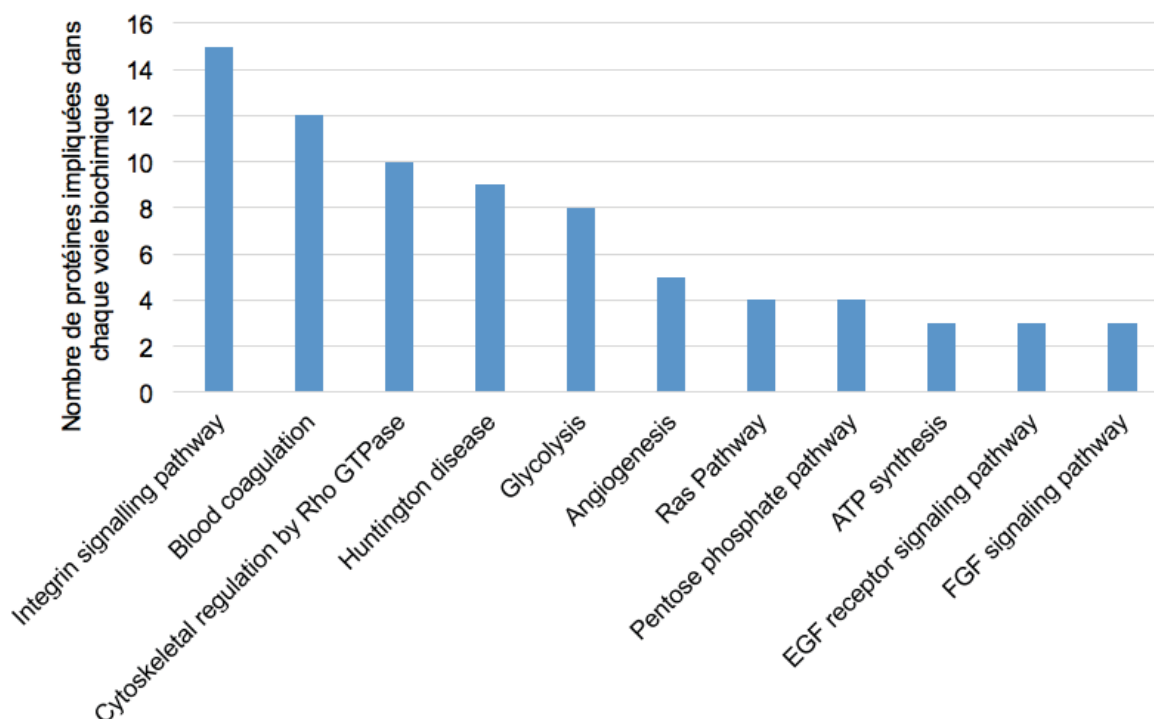


Figure 12 : Nombre de protéines impliquées dans diverses voies biochimiques, telles qu'identifiées par le logiciel *Panther*. Les protéines étudiées correspondent aux 252 protéines les plus abondantes de l'échantillon 10V0. Bien qu'ils soient en langue anglaise, les termes *Panther* ont été employés dans cette figure afin d'éviter toute erreur de traduction.

3.3 Modulation de l'expression protéique par la lovastatine dans les échantillons d'individus SXF

Pour chaque patient, l'analyse des échantillons avant et après traitement à la lovastatine a permis d'identifier plusieurs protéines modulées à la hausse ou à la baisse. Pour chaque patient, environ 75% des protéines étaient identifiées et quantifiées dans les échantillons avant et après traitement (permettant ainsi une analyse de leur variation).

Les analyses statistiques effectuées sur l'ensemble des participants révèlent que 55 protéines semblent avoir été augmentées de manière significative par le traitement. Le tableau 16 révèle les protéines augmentées dans nos échantillons ainsi que la variation médiane entre les échantillons pré et post-traitements ($[V4-V0]/V0$). Parmi les protéines significativement augmentées, on remarque que plusieurs sont impliquées dans le métabolisme du cholestérol (Apo-B100, Apo-E, Apo-A1 et *oxysterol binding protein-1*) et

la signalisation (intégrine alpha-2, intégrine bêta-1 et antigène CD9). L'hexokinase est également augmentée de manière significative dans nos échantillons.

Bien que nos analyses suggèrent que 55 protéines semblent avoir été augmentées par le traitement, nos analyses de FDR suggèrent que certaines de ces protéines pourraient avoir été identifiées par une erreur de type I. Plus exactement, notre étude du FDR permet d'estimer qu'environ 29 protéines seraient faussement identifiées à la hausse. Tel que décrit à la section 2.1.3, le FDR a été calculé en multipliant le risque d'erreur alpha (alpha bilatéral = 0,05) avec le nombre de protéines ayant été analysées statistiquement ($n = 1169$).

Tableau 16 : Protéines significativement augmentées par le traitement à la lovastatine chez les individus de l'étude LovaX

Identifiant <i>UniProt</i>	Nom des protéines	Variation médiane (%)
O95870	<i>Abhydrolase domain-containing protein 16A</i>	+18,8
P61158	<i>Actin-related protein 3</i>	+32,1
Q96HN2-2	<i>Adenosylhomocysteinase 3</i>	+62,9
P49588	<i>Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic</i>	+32,2
P01023	<i>Alpha-2-macroglobulin</i>	+79,7
Q96IU4	<i>Alpha/beta hydrolase domain-containing protein 14B</i>	+35,9
P02647	<i>Apolipoprotein A-I</i>	+25,6
P04114	<i>Apolipoprotein B-100</i>	+85,1
P02649	<i>Apolipoprotein E</i>	+26,8
P14868	<i>Aspartate--tRNA ligase, cytoplasmic</i>	+63,2
P55957-2	<i>BH3-interacting domain death agonist</i>	+25,8
P27824	<i>Calnexin</i>	+18,7
P21926	<i>CD9 antigen</i>	+38,7
O76074	<i>cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase</i>	+30,5
Q96DZ9-2	<i>CKLF-like MARVEL transmembrane domain-containing protein 5</i>	+8,7
Q9Y678	<i>Coatamer subunit gamma-1</i>	+9,4
Q9Y4D1-2	<i>Disheveled-associated activator of morphogenesis 1</i>	+28,9
Q7Z6Z7-2	<i>E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1</i>	+61,7
P15170-2	<i>Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3A</i>	+41,3
P55884-2	<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B</i>	+26,1

Q99613	<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C</i>	+90,9
P78344	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2</i>	+75,5
P63241-2	<i>Eukaryotic translation initiation factor 5A-1</i>	+8,7
A0FGR8-2	<i>Extended synaptotagmin-2</i>	+29,6
Q3ZCW2	<i>Galectin-related protein</i>	+18,6
Q9UEY8-2	<i>Gamma-adducin</i>	+43,7
P11413-2	<i>Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase</i>	+21,3
P43304	<i>Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial</i>	+21,5
P19086	<i>Guanine nucleotide-binding protein G(z) subunit alpha</i>	+30,4
P19367	<i>Hexokinase-1</i>	+17,6
P01859	<i>Ig gamma-2 chain C region</i>	+41,5
P17301	<i>Integrin alpha-2</i>	+13,5
P05556	<i>Integrin beta-1</i>	+10,3
P19823	<i>Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2</i>	+305,8
Q9UNF1	<i>Melanoma-associated antigen D2</i>	+115,6
P00387-2	<i>NADH-cytochrome b5 reductase 3</i>	+15,0
Q8NBF2	<i>NHL repeat-containing protein 2</i>	+58,0
P22059	<i>Oxysterol-binding protein 1</i>	+57,3
P48426	<i>Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase type-2 alpha</i>	+155,2
Q15149-4	<i>Plectin</i>	+11,5
O60610-3	<i>Protein diaphanous homolog 1</i>	+43,7
P00491	<i>Purine nucleoside phosphorylase</i>	+15,5
P55786	<i>Puromycin-sensitive aminopeptidase</i>	+24,5
P61106	<i>Ras-related protein Rab-14</i>	+25,8
Q96AX2-4	<i>Ras-related protein Rab-37</i>	+18,6
Q9NRW1	<i>Ras-related protein Rab-6B</i>	+19,1
Q16799	<i>Reticulon-1</i>	+39,5
P67812	<i>Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11A</i>	+15,0

P16949	<i>Stathmin</i>	+43,5
P04179	<i>Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial</i>	+19,8
P26639	<i>Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic</i>	+29,3
P54577	<i>Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic</i>	+45,7
Q06124-2	<i>Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11</i>	+77,6
P49748	<i>Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial</i>	+8,9
Q9NQW7	<i>Xaa-Pro aminopeptidase 1</i>	+32,3

NB : Pour chaque protéine, le test des rangs signés de Wilcoxon a été appliqué. Pour chaque protéine ci-dessus, la somme des rangs signés était inférieure au seuil critique du test ayant un $p < 0,05$ bilatéral. Une valeur p précise ne peut donc pas être calculée pour chaque protéine. Bien qu'ils soient en langue anglaise, les termes *UniProt* ont été employés dans ce tableau afin d'éviter toute erreur de traduction. Les protéines sont présentées en ordre alphabétique pour faciliter la lecture du tableau.

À l'inverse, 30 protéines semblent avoir été statistiquement significativement diminuées par le traitement. Le tableau 17 révèle les protéines diminuées dans nos échantillons ainsi que la variation médiane entre les échantillons pré et post-traitements ($[V4-V0]/V0$). Bien que nos analyses suggèrent que 30 protéines semblent avoir été diminuées par le traitement, nos analyses de FDR suggèrent que certaines de ces protéines pourraient avoir été identifiées par une erreur de type I. Plus exactement, notre étude du FDR suggère que 29 protéines seraient faussement identifiées à la baisse.

Tableau 17 : Protéines significativement diminuées par le traitement à la lovastatine chez les individus de l'étude LovaX

Identifiant <i>UniProt</i>	Nom des protéines	Variation médiane (%)
O43488	<i>10 kDa heat shock protein, mitochondrial</i>	-21,6
O43516-3	<i>Adapter molecule crk</i>	-13,3
O75347	<i>Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2</i>	-13,9
O94903	<i>Arf-GAP domain and FG repeat-containing protein 1</i>	-52,2
O95197-2	<i>ATP synthase subunit alpha, mitochondrial</i>	-13,8
P23219	<i>Carbonic anhydrase 13</i>	-23,3
P25705	<i>Coatomer subunit delta</i>	-35,2
P30084	<i>DNA damage-binding protein 1</i>	-22,3
P35237	<i>Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial</i>	-18,5

P46108	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4H</i>	-17,7
P48444	<i>Four and a half LIM domains protein 1</i>	-41,8
P49720	<i>Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like protein</i>	-45,1
P51148	<i>GTP-binding nuclear protein Ran</i>	-38,2
P52594-2	<i>Mammalian ependymin-related protein 1</i>	-36,8
P61225	<i>NEDD8-activating enzyme E1 regulatory subunit</i>	-10,4
P61604	<i>Proline synthase co-transcribed bacterial homolog protein</i>	-56,7
P62826	<i>Prostaglandin G/H synthase 1</i>	-15,8
Q13564	<i>Proteasome subunit beta type-3</i>	-52,8
Q13642-1	<i>Ragulator complex protein LAMTOR1</i>	-25,7
Q15056-2	<i>Ras-related protein Rab-18</i>	-42,7
Q15257-2	<i>Ras-related protein Rab-5C</i>	-11,9
Q16531	<i>Ras-related protein Rap-2b</i>	-35,0
Q6IAA8	<i>Reticulon-3</i>	-27,9
Q8N1Q1	<i>Ribosome maturation protein SBDS</i>	-40,4
Q8N335	<i>Serine/threonine-protein phosphatase 2A activator</i>	-31,2
Q96QR8	<i>Serpin B6</i>	-23,0
Q9NP72	<i>Transcriptional activator protein Pur-beta</i>	-56,3
Q9UM22	<i>Tubulin-specific chaperone A</i>	-14,5
Q9Y385	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 J1</i>	-14,5
Q9Y3A5	<i>WAS/WASL-interacting protein family member 1</i>	-53,7

NB : Pour chaque protéine, le test des rangs signés de Wilcoxon a été appliqué. Pour chaque protéine ci-dessus, la somme des rangs signés était inférieure au seuil critique du test ayant un $p < 0,05$ bilatéral. Une valeur p précise ne peut donc pas être calculée pour chaque protéine. Bien qu'ils soient en langue anglaise, les termes *UniProt* ont été employés dans ce tableau afin d'éviter toute erreur de traduction. Les protéines sont présentées en ordre alphabétique pour faciliter la lecture du tableau.

Mentionnons que la protéine GRP78 a été détectée dans nos échantillons, mais que l'expression de celle-ci n'a pas été modifiée de manière significative par le traitement à la lovastatine, contrairement aux résultats obtenus par Molins *et al.* (2010). Rappelons que les conditions expérimentales de l'étude réalisée par Molins *et al.* étaient très différentes des nôtres (emploi d'un modèle porcin, incubation avec de la rosuvastatine *in vitro*, et analyse protéomique par 2D-DIGE).

3.4 Résultats de l'étude LovaC (individus sains recevant la lovastatine)

3.4.1 Caractéristiques des participants de l'étude LovaC et innocuité du traitement

Au total, 18 participants ont été recrutés pour le déroulement de l'étude LovaC (dont la méthodologie est décrite à la section 2.2). Parmi les individus recrutés, deux ont dû être exclus en raison de nos critères (un en raison d'un niveau trop bas de LDL et un en raison d'un antécédent de dystrophie musculaire). Un seul participant s'est retiré de l'étude en raison de céphalées, bien que nous ayons jugé improbable que ce symptôme ait été provoqué par la lovastatine, puisqu'il présentait déjà des céphalées de manière récurrente. Quinze participants sains ont donc terminé l'étude. Les caractéristiques démographiques des participants ayant terminé l'étude sont présentées dans le tableau 18 et leur habitus au tableau 19.

Tableau 18 : Caractéristiques démographiques des participants de l'étude LovaC

Âge médian (ans)	22
Genre (H/F)	13/2
Race	
Caucasien (n)	14
Asiatique (n)	1
IMC médian (kg/m ²)	23,4
Tour de taille médian (cm)	80

Tableau 19 : Habitus des participants de l'étude LovaC

Tabagisme actif (n)	1
Consommation médiane d'alcool par semaine	5
Consommation occasionnelle de cannabis (n)	2
Sédentarité (n)	2

Seulement 6% des doses de lovastatine ont été oubliées par les participants (observance 94%) et la durée moyenne du traitement a été de 45 jours.

Globalement, les participants de l'étude LovaC étaient des jeunes en bonne santé. Au cours de l'étude, un participant a été traité pour une amygdalite avec de l'amoxicilline + acide clavulanique, un participant a pris de la lisdexamfétamine pour son TDAH, un

participant a pris de la minocycline pour son acné et une participante prenait la pilule contraceptive (désogestrel + éthinyliestradiol). Cinq participants ont pris de l'ibuprofène de manière sporadique, quatre ont pris de l'acétaminophène et un a pris du lopéramide, du naproxène et de la loratadine.

Durant l'étude, aucun effet indésirable grave n'a été rapporté. Aucune grossesse n'est survenue chez les participantes. Seulement trois participants ont rapporté avoir des myalgies après avoir fait de l'exercice physique. Le traitement a donc été bien toléré par la majorité des participants.

3.4.2 Données biochimiques recueillies durant l'étude LovaC

Durant l'étude LovaC, des données biochimiques ont été collectées avant et après traitement à la lovastatine. Notamment, la variation du bilan lipidique induite par le traitement a été étudiée. Durant l'étude LovaC, le cholestérol total, le cholestérol LDL et l'Apo-B ont tous été significativement diminués par le traitement (Tableau 20). Des diminutions comparables avaient également été observées durant l'étude LovaX (réalisée chez des individus avec SXF). Toutefois, chez ces derniers, une diminution des triglycérides a également été observée en réponse à la lovastatine (Tableau 20). Une diminution significative des triglycérides n'a cependant pas été observée durant notre étude chez des individus sains. Le glucose, les CK, l'ALT et la formule sanguine des participants n'ont pas été modulés de manière significative par notre traitement.

Tableau 20 : Modulation du bilan lipidique par la lovastatine ; comparaison entre cohorte d'individus sains (LovaC) ou avec SXF (LovaX)

Biomarqueur	Valeur <i>p</i> LovaC (test du signe)	Variation médiane LovaC	Variation médiane LovaX
C-Total	0,0045 *	- 15,7 %	- 26,2 %
LDL	0,0045 *	- 31,8 %	- 42,2 %
Apo-B	0,0008 *	- 21,3 %	- 28,3 %
TG	0,4386	-7,4 %	- 25,2 %

* Résultats statistiquement significatifs ($p < 0,05$).

3.5 Efficacité du protocole de congélation des plaquettes

Afin de vérifier l'intégrité des plaquettes sanguines ayant subi notre protocole de congélation décrit à la section 2.4.2, nous avons procédé à un décompte cellulaire avant/après congélation et à une quantification de FMRP avant/après congélation sur un échantillon.

Dans l'échantillon analysé, la concentration de plaquettes avant congélation était de $332,3 \times 10^9/L$. Après 132 jours au congélateur à $-80^\circ C$, ce même échantillon a été décongelé. La concentration de plaquettes était alors de $336,3 \times 10^9/L$, ce qui est identique à la valeur obtenue avant la congélation (compte tenu de la marge d'erreur de l'appareil).

Afin de vérifier l'intégrité du protéome dans les plaquettes congelées, une quantification de FMRP a été effectuée par WB sur un même échantillon avant/après congélation. La protéine FMRP a été choisie, puisqu'elle est extrêmement sensible à la dégradation. Le ratio FMRP/tubuline mesuré par WB sur l'échantillon avant congélation était de 3,04. Le ratio FMRP/tubuline mesuré après 17 jours de congélation était de 2,93. Une comparaison de ces résultats indique que 96,4% de la protéine FMRP a été préservée lors du protocole de congélation, ce qui suggère que le protéome est demeuré intact.

4. DISCUSSION

Ce projet avait pour objectif d'explorer le protéome d'individus SXF ayant reçu un traitement de lovastatine. L'objectif de ces analyses était d'identifier des protéines ayant pu être modulées par le traitement reçu. Les protéines identifiées comme ayant été augmentées ou diminuées par la lovastatine forment une liste de biomarqueurs potentiels de grand intérêt. En effet, les protéines ainsi identifiées pourront être étudiées dans le cadre de projets futurs, puisque ces protéines pourraient permettre d'expliquer biochimiquement comment la lovastatine peut induire une amélioration clinique dans le SXF. Afin de connaître les modulations induites par la lovastatine sur le protéome plaquettaire chez des individus avec SXF, j'ai effectué des analyses LC-MS/MS du protéome plaquettaire des échantillons prélevés durant l'étude de Çaku *et al.* (2014). Dans le but d'éventuellement identifier des modulations protéomiques spécifiques aux individus SXF, j'ai également recruté une cohorte d'individus sains, et je leur ai administré de la lovastatine à dose de 40 mg PO une fois par jour. Les échantillons ainsi prélevés pourront éventuellement être analysés par LC-MS/MS afin de comparer les effets de la lovastatine chez les individus sains *versus* ceux avec SXF.

4.1 Analyse des résultats LC-MS/MS d'individus SXF

4.1.1 Technique d'analyse LC-MS/MS employée

Malgré la présence de SDS dans nos échantillons de protéines, nous avons tout de même réussi à effectuer une caractérisation approfondie du protéome plaquettaire. Puisque les échantillons de plaquettes prélevés durant l'étude LovaX étaient préparés dans une solution de SB contenant 2% de SDS, nous avons été contraints d'utiliser une méthode d'analyse adaptée à cette situation. La présence de SDS dans les échantillons rend plus difficile l'analyse du protéome par LC-MS/MS, puisque le SDS dénature les enzymes de digestion (ex : trypsine) pouvant être utilisées pour découper les protéines en peptides (une étape cruciale dans l'identification des protéines en spectrométrie de masse). Dans ce contexte, une digestion en solution des protéines était impossible. Nous avons donc dû employer une technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide afin d'éliminer le SDS des échantillons, puis nous avons procédé à une digestion sur gel des protéines avec la trypsine. Bien que les techniques de digestion sur gel aient en général un rendement moindre

que les techniques de digestion en solution, on constate que notre technique expérimentale a tout de même permis d'identifier et de quantifier un grand nombre de protéines. On peut attribuer cette réussite à plusieurs facteurs. Notamment, l'appareil *Orbitrap Q-Extractive Plus* (Termo Fisher Scientific) employé pour nos analyses MS/MS est à la fine pointe de la technologie et a permis une caractérisation très approfondie du protéome. De plus, tel que démontré à la section 3.1, l'optimisation de notre méthode de préparation des échantillons a permis d'améliorer grandement le rendement de nos analyses protéomiques. En excisant certaines zones sur nos gels de polyacrylamide et en injectant nos échantillons en deux fractions dans l'appareil LC-MS/MS, nous avons grandement diminué l'abondance de l'albumine (un contaminant issu du plasma) et des protéines du cytosquelette qui empêchaient la détection des protéines moins abondantes de nos échantillons.

Lorsque nos résultats sont comparés à ceux d'autres études sur le protéome plaquettaire, on observe que le nombre de protéines identifiées dans nos échantillons (1731) est considérable. Par exemple, les études de Maurer-Spurej *et al.* (2008) et de Qureshi *et al.* (2009) ont aussi été réalisées par SDS-PAGE et avaient permis d'identifier respectivement 1044 et 1507 protéines dans les plaquettes (Maurer-Spurej *et al.*, 2008; Qureshi *et al.*, 2009). À notre connaissance, une seule étude utilisant une technique de digestion sur gel a permis d'obtenir une caractérisation plus approfondie du protéome plaquettaire (Klockenbusch *et al.*, 2014). Cette étude ayant identifié 2559 protéines a cependant été réalisée en injectant 40 fractions d'un même échantillon sur un appareil LC-MS/MS. Étant donné le nombre important d'échantillons à analyser dans le cadre de notre étude, un nombre aussi important de fractionnements ne pouvait pas être effectué avec nos échantillons. Bien que certaines études utilisant des techniques de digestion en solution aient permis d'identifier un nombre plus élevé de protéines dans des échantillons plaquettaires (Boyanova *et al.*, 2012; Burkhart *et al.*, 2012), de telles techniques ne pouvaient pas être appliquées sur nos échantillons préparés durant l'étude LovaX et contenant du SDS. Notre expérience avec la technique de préparation FASP (permettant d'éliminer le SDS à l'aide d'un filtre) s'est également révélée infructueuse, puisque cette technique générait sur nos échantillons des pertes très importantes de protéines (résultats non publiés).

Notre protocole a permis d'identifier des protéines issues de différentes localisations cellulaires. Notamment, les protéines membranaires (terme GO 0016020) représentent

environ 10% des protéines les plus abondantes de l'échantillon prétraitement du participant #10. Ces protéines sont pourtant réputées être difficiles à identifier en raison de leur faible hydrosolubilité. En somme, bien que notre technique d'analyse LC-MS/MS ait été limitée par la présence de SDS dans nos échantillons, nous avons réussi à obtenir une caractérisation approfondie du protéome plaquettaire.

4.1.2 Caractéristiques du protéome plaquettaire des individus SXF

Le protéome plaquettaire que nous avons caractérisé chez les individus SXF est similaire à celui identifié auprès d'individus sains dans d'autres études publiées. Tel que décrit par Burkhardt *et al.* (2012), un faible nombre de protéines très abondantes génère la majorité de l'intensité du spectre LC-MS/MS. De nombreuses protéines peu abondantes sont cependant plus difficiles à identifier et à quantifier. Par exemple, nos analyses LC-MS/MS ne permettent pas d'identifier la protéine FMRP, bien que celle-ci soit présente dans les plaquettes et détectable par WB chez les individus contrôles (Lessard *et al.* 2012). Puisque les échantillons analysés proviennent de patients souffrant du SXF, il est plus difficile d'y détecter la protéine FMRP, celle-ci étant très faiblement exprimée. De plus, nos résultats confirment que les plaquettes sont particulièrement riches en protéines impliquées dans divers processus. Notamment, les protéines du cytosquelette sont très abondantes, ainsi que les protéines impliquées dans la morphogénèse de composés cellulaires, la coagulation et la signalisation des intégrines. Le protéome que nous identifions dans les plaquettes d'individus SXF possède les mêmes caractéristiques générales que celui identifié lors d'autres études sur cette lignée cellulaire (Boyanova *et al.*, 2012; Burkhardt *et al.*, 2012). Puisque les changements protéomiques induits par l'absence de FMRP sont généralement subtils, cette constatation n'invalide pas notre démarche employant les plaquettes en tant que modèle intéressant pour l'étude du SXF.

4.1.3 Les plaquettes : un modèle intéressant pour l'étude du SXF

Certaines observations émanant de nos analyses protéomiques confirment l'intérêt porté aux plaquettes afin d'étudier la physiopathologie du SXF et d'identifier des biomarqueurs.

D'abord, on observe que les plaquettes sont pauvres en protéines nécessaires à la

transcription et à la traduction. Ce constat confirme que le protéome des plaquettes est majoritairement hérité des mégacaryocytes et qu'elles ont un potentiel très limité à produire de nouvelles protéines une fois en circulation. Cette stabilité du protéome est importante, puisqu'elle facilite l'identification de biomarqueurs fiables en minimisant l'effet des variations biologiques (ex : inflammation, infection) ou analytiques (ex : ponction veineuse, purification des plaquettes).

On confirme également l'abondance de protéines impliquées dans la signalisation au sein des plaquettes, dont plusieurs membres de la cascade MAPK/ERK. À l'instar des neurones, l'abondance des protéines de la voie MAPK/ERK rappelle l'importance de cette dernière dans les plaquettes. Cette voie de signalisation étant importante dans les mégacaryocytes et les plaquettes, nous pouvons aisément croire que l'utilisation de la lovastatine pourrait avoir des répercussions importantes sur le protéome.

Les protéines impliquées dans le transport des vésicules sont également identifiées en abondance lors de nos analyses (voir tableau 15). Ce processus cellulaire très similaire à celui permettant la libération de neurotransmetteurs dans les fentes synaptiques est donc important dans les plaquettes. Cette analogie entre les plaquettes et les neurones contribue à la validité du modèle plaquettaire dans l'étude du SXF.

4.1.4 Comparaison quantitative fiable des protéines

Nos analyses LC-MS/MS de type *label free* permettent une comparaison quantitative fiable du nombre de protéines identifiées avant/après traitement. La comparaison des spectres est fiable, puisque le nombre de protéines identifiées avant/après traitement n'est pas significativement différent. Cette similarité dans le nombre de protéines identifiées pré/post-traitement est nécessaire, puisque cela permet d'assurer qu'il n'y ait pas de biais systématique dans l'identification de protéines à la hausse ou à la baisse. Seuls les échantillons du participant #9 font exception, puisque pour ce participant, la quantité de protéines dans l'échantillon prétraitement ($n = 820$ protéines) était inférieure à la quantité dans l'échantillon post-traitement ($n = 1238$ protéines). L'analyse des résultats a été effectuée avec et sans ce couple de données. L'exclusion des données du participant #9 avait

somme toute peu d'effet sur nos résultats. Il a donc été convenu de conserver ces données lors de nos analyses finales, considérant le nombre restreint d'échantillons dans nos analyses.

Il est également important de mentionner que notre devis de recherche permet de comparer les échantillons des mêmes participants, de sorte que la variabilité inter-individus est annulée. Cela est important, puisque la variabilité inter-individus dans les analyses protéomiques est souvent importante, ce qui rend difficile l'identification de biomarqueurs fiables. Puisque la variabilité biologique du protéome plaquettaire est présumée faible, nos analyses permettent d'isoler la variabilité due au traitement et la variabilité analytique.

4.1.5 La lovastatine induit des changements protéomiques possiblement importants pour les individus avec SXF

Nos résultats démontrent que certaines protéines semblent avoir été modulées à la hausse ou à la baisse par le traitement à la lovastatine. Il est probable que certaines protéines modulées par la lovastatine soient spécifiques à la réponse au traitement chez les individus SXF. Par exemple, on observe une augmentation significative de l'hexokinase-1 (Md = +18%) en réponse au traitement. Cette modification de l'hexokinase-1 est particulièrement intéressante, puisque des modifications au niveau de la glycolyse pourraient être impliquées dans la physiopathologie du SXF. Notamment, A. Bhattacharya a présenté au *Gordon Research Conference on Fragile X and Autism-Related Disorders* (Mount Snow, 2016/06/06) une présentation révélant que l'hexokinase-1 était significativement diminuée dans le plasma de souris *Fmr1* KO analysé par approche protéomique BONLAC (résultats non publiés). De plus, l'ARNm de l'hexokinase-1 est une cible connue de la protéine FMRP (Darnell *et al.*, 2011). Puisque FMRP exerce un contrôle sur l'expression de cette protéine, il est possible que les individus SXF aient une expression dérégulée de l'hexokinase-1 et que la lovastatine contribue à renverser ce phénotype.

Une analyse attentive de nos résultats révèle que notre liste de protéines modulées par la lovastatine contient de nombreuses protéines ciblées par FMRP. Parmi les 55 protéines augmentées par la lovastatine, cinq sont issues d'ARNm ciblés par FMRP ayant été identifiés par Darnell *et al.* (2011) par une technique HITS-CLIP qui est une référence dans le domaine. Ces protéines sont l'Apo-E, l'eIF4G2, l'hexokinase-1, la GNAZ et la réticulon-1. Pour leur part, les protéines ATP5A1 et réticulon-3 sont également des cibles de FMRP, mais leur

expression semble être diminuée par le traitement à la lovastatine. Une analyse statistique a été effectuée afin de savoir si les cibles de FMRP sont surreprésentées parmi notre liste de protéines modulées. L'analyse effectuée permet donc d'assurer que la modulation de ces protéines cibles ne soit pas le fruit du hasard (erreurs de type II). On constate que parmi les protéines modulées par le traitement à la lovastatine, 7/85 (soit 8,24%) ont été identifiées en tant que cibles de FMRP par Darnell *et al.* (2011). Parmi l'ensemble des protéines que nous avons identifiées et soumises à nos analyses statistiques, 35/1169 (soit 2,99%) ont également été identifiées par Darnell *et al.* (2011). Si l'identification de cibles de FMRP parmi notre liste de protéines modulées n'était que le fruit du hasard, la distribution de probabilités de ces événements suivrait une loi hypergéométrique de paramètres $N = 1169$, $n = 85$ et $P = 35/1169$. Selon cette modélisation, l'identification de 7 cibles de FMRP parmi notre échantillon de 85 protéines serait un événement très improbable ($p = 0,011$). Donc, les cibles de FMRP sont bel et bien surreprésentées parmi les protéines modulées par le traitement à la lovastatine. L'abondance de cibles de FMRP parmi notre courte liste de protéines modulées suggère que cette molécule puisse avoir un effet important chez les individus SXF.

Il est difficile de savoir si la lovastatine a modulé l'expression de ces protéines dans une direction permettant de normaliser leur expression chez les individus SXF. Plus précisément, on ne peut savoir avec certitude si les protéines augmentées par la lovastatine seraient sous-exprimées chez les individus SXF et *vice versa*. Cette difficulté provient du fait que nous ne savons donc pas avec certitude quelles protéines seraient surexprimées ou sous-exprimées en SXF, puisque les données protéomiques dont nous disposons ne sont que partielles. Tel que montré par A. Bhattacharya au *Gordon Research Conference on Fragile X and Autism-Related Disorders* (Mount Snow, 2016/06/06), l'hexokinase-1 serait significativement diminuée chez la souris *Fmr1* KO (résultats non publiés). Notre traitement à la lovastatine permettant d'augmenter l'expression de l'hexokinase, il semblerait donc que la lovastatine tend à normaliser l'expression de cette protéine. Afin de savoir si les autres protéines modulées par la lovastatine ont été augmentées ou diminuées dans une direction permettant de normaliser leur expression, il serait nécessaire d'effectuer l'analyse LC-MS/MS de nos échantillons prélevés chez des individus contrôles, tel que discuté à la section 5.2 (perspectives futures).

4.1.6 La lovastatine induit des changements protéomiques possiblement non-spécifiques

Il est raisonnable de croire que certaines des modifications induites par la lovastatine soient le résultat d'un effet non-spécifique de la lovastatine, c'est-à-dire que ces changements résultent d'une altération du métabolisme des lipides. En d'autres termes, il est probable que ces modifications puissent survenir autant chez les individus SXF que chez les individus sains.

Par exemple, dans nos échantillons plaquettaires, on note une augmentation surprenante de l'Apo-B100 (Md = +85%), une protéine liée aux particules de VLDL, d'IDL et de LDL ; et de l'Apo-E (Md = +27%), une protéine propre aux VLDL et aux IDL (voir tableau 16). Cette augmentation de l'Apo-B100 et de l'Apo-E va totalement à l'inverse de ce qui est observé dans le plasma. Ce résultat suggère que le traitement avec une statine augmente surprenamment l'association entre les plaquettes et les particules circulantes de VLDL, d'IDL et de LDL. Ce phénomène pourrait être un nouveau mécanisme permettant d'expliquer l'effet hypolipémiant des statines. À notre connaissance, un tel phénomène n'avait jamais été décrit précédemment. De plus, puisque l'Apo-E et l'Apo-B100 diminuent dans le plasma et augmentent dans nos échantillons de protéines plaquettaires, cette variation ne peut pas être expliquée par une contamination de nos échantillons par les protéines du sérum.

Parallèlement, on observe dans nos échantillons de plaquettes une augmentation de l'apo-A1 (Md = +26%), une protéine associée aux HDL (voir tableau 16). Puisque le HDL sérique n'est pas augmenté de manière significative lors du traitement à la lovastatine, ce résultat suggère une plus grande association entre les plaquettes et les particules de HDL lors du traitement.

On observe également une augmentation significative de l'*oxysterol-binding protein 1* (Md = +57%, voir tableau 16), qui a pour fonction biologique de réguler le niveau cytoplasmique de cholestérol et de ses analogues. On peut donc croire que cette protéine pourrait être un biomarqueur intéressant pour vérifier l'observance à un traitement aux statines, puisqu'elle est facile à prélever en périphérie, facile à isoler et à détecter au MS. Cette protéine pourrait être un biomarqueur objectif de l'observance aux statines, ce qui permettrait possiblement de distinguer les individus ayant une mauvaise observance au traitement de ceux ayant une résistance aux statines. Évidemment, il serait nécessaire

d'effectuer des expériences de validation afin de baliser l'utilisation éventuelle d'un tel biomarqueur.

En plus de ces modifications au niveau du métabolisme lipidique, on observe que le traitement à la lovastatine induit des changements dans l'expression de protéines impliquées dans l'activation et l'agrégation plaquettaire. Par exemple, on observe une augmentation de l'intégrine $\alpha 2$ (Md = +13%), de l'intégrine $\beta 1$ (Md = +10%) et de l'antigène CD9 (Md = +39%, voir tableau 16). On observe également une diminution significative de la COX-1 (Md = -16%, voir tableau 17), une protéine importante dans la synthèse des prostaglandines et l'activation des plaquettes. Ces résultats sont très intéressants, à la vue d'une vaste littérature suggérant que les plaquettes aient un effet antithrombotique (Du *et al.*, 2014; Owens et Mackman, 2014; Pignatelli *et al.*, 2012a; Stach *et al.*, 2012; Tsai *et al.*, 2011). Ne disposant pas de tests d'hémostase ayant été faits durant l'étude LovaX, on ignore les répercussions exactes de ces modulations protéomiques sur l'activité plaquettaire.

Nos résultats peuvent être comparés à ceux obtenus par Xiao *et al.* (2015) dans une étude protéomique LC-MS/MS sur l'effet de l'atorvastatine (un médicament de la même classe que la lovastatine, inhibiteur de l'HMG-CoA réductase) sur une lignée d'hépatocytes immortalisés (HepG2) (Xiao *et al.*, 2015). Bien qu'il puisse être attendu que les hépatocytes et les plaquettes aient une réponse très différente lors de l'exposition aux statines, il est intéressant de remarquer que certains changements sont similaires. Par exemple, tout comme nous, Xiao *et al.* ont observé une augmentation significative de l'Apo-B100. De plus, ils ont observé une augmentation de l'Apo-A4, mais pas de l'Apo-A1. Rappelons qu'il est possible que ces résultats puissent être communs aux individus SXF et aux individus sains, puisque ces modifications protéomiques pourraient résulter d'un effet général des statines sur le métabolisme lipidique.

4.2 Forces et limites de notre étude du protéome plaquettaire avant/après traitement chez les individus avec SXF

4.2.1 Forces de notre étude protéomique

De nombreuses forces peuvent être attribuées à notre étude des protéines modulées par la lovastatine dans les échantillons d'individus avec SXF. D'abord, bien que nos échantillons de protéines aient été préparés dans une solution contenant 2% de SDS, notre

technique d'analyse (usage de bons appareils et optimisation du protocole de préparation des échantillons) a permis d'identifier un grand nombre de protéines avant/après traitement. La quantification de protéines avant/après traitement chez les mêmes individus permet de limiter la variation inter-individus, de sorte qu'il est plus facile de détecter des biomarqueurs significatifs. Le caractère novateur de notre étude doit aussi être mentionné, puisque nous sommes les premiers à employer une approche protéomique *shotgun* pour caractériser le protéome d'individus SXF. Enfin, faisons remarquer que les protéines identifiées lors de nos analyses sont des biomarqueurs potentiellement très intéressants. Bien que cela doive être confirmé, il est probable que certains de ces protéines soient issus d'un effet spécifique de la lovastatine chez les individus SXF, ou que la lovastatine puisse normaliser l'expression de certaines protéines chez les individus SXF. De plus, ces biomarqueurs potentiels suggèrent de nouveaux mécanismes d'interaction entre les plaquettes sanguines et les lipoprotéines circulantes.

4.2.2 Limites de notre étude protéomique

Certaines limites de la présente étude doivent cependant être mentionnées. D'abord, une étude du FDR suggère que notre liste de protéines identifiées à la hausse ou à la baisse pourrait contenir de nombreuses protéines issues d'une erreur alpha. Plus exactement, notre étude du FDR suggère que 29 protéines seraient faussement identifiées à la hausse et que 29 protéines seraient faussement identifiées à la baisse. Plutôt que d'avoir été véritablement modulées par la lovastatine, ces protéines seraient identifiées par l'effet du hasard puisque notre test statistique a été appliqué de manière répétée. Les présents résultats doivent donc impérativement être traités avec retenue, et devront être confirmés par l'usage d'une autre méthode d'analyse quantitative. Comme il sera décrit de manière détaillée dans les *perspectives futures* (section 5.2), de telles analyses seront bientôt effectuées. Malheureusement, étant donné l'utilisation du test des rangs signés de Wilcoxon et le petit nombre d'échantillons, nous n'avons pas pu appliquer le facteur d'ajustement de Bonferroni lors de l'analyse statistique de nos résultats LC-MS/MS. Dans d'autres circonstances, l'application d'un tel facteur de correction aurait permis de diminuer le FDR de nos analyses.

Aussi, des travaux réalisés par notre laboratoire suggèrent que la variabilité analytique des études LC-MS/MS de type *shotgun* est considérable. Précisément, des

échantillons identiques de protéines plaquettaires dénaturées avec urée 8M puis digérées en solution à la trypsine ont été analysés sur trois plateformes LC-MS/MS (respectivement à l'Université de Sherbrooke, à l'Université Laval et à l'IRIC). De manière surprenante, seulement 175 des 1355 protéines identifiées ont été reconnues par les trois appareils LC-MS/MS (soit seulement 12,9% des protéines ; résultats non publiés). Ces résultats suggèrent que la variabilité analytique associée à l'approche *shotgun* par LC-MS/MS est très importante pour l'identification et la quantification des protéines. Une variabilité analytique aussi grande rend très difficile l'identification de biomarqueurs, puisque cette variabilité masque les altérations subtiles du protéome en réponse à la lovastatine. Ceci confirme le besoin d'utiliser une approche quantitative fiable pour valider la modulation de biomarqueurs avant/après traitement.

On peut également mentionner que le petit nombre d'échantillons analysés durant notre étude limite la portée de nos résultats. Puisque l'étude LovaX était de petite taille ($n = 15$) et parce que la technique d'analyse que nous avons employée était dispendieuse, seul un nombre limité d'analyses a pu être effectué dans le cadre de nos travaux. Un petit nombre d'échantillons rend difficile l'identification de biomarqueurs fiables par approche protéomique *shotgun*.

Lors de nos analyses, nous avons procédé à l'excision de certaines bandes sur le gel SDS-PAGE de nos échantillons de protéines plaquettaires. Tel qu'expliqué à la section 2.1.2, l'excision de ces bandes a été effectuée dans le but de réduire l'abondance des protéines du cytosquelette et de l'albumine dans nos échantillons. Cette technique expérimentale a bel et bien permis de diminuer l'expression de ces protéines du cytosquelette, mais il est possible qu'elle ait également entraînée le retrait de certaines protéines d'intérêt hors de nos échantillons. En raison de cette technique, il est donc possible que quelques protéines d'intérêt aient échappé à nos analyses.

Lors de nos analyses, nous avons constaté que certaines protéines plasmatiques (ex : albumine) étaient facilement détectables dans nos échantillons plaquettaires. Il est malheureusement impossible d'éliminer entièrement le plasma hors de nos échantillons, puisque les plaquettes ont une structure poreuse permettant au plasma de s'infiltrer dans leur système canaliculaire ouvert. Il est possible que des modulations dans l'expression plasmatique de certaines protéines ait pu influencer nos résultats : les modulations protéiques

observées sont-elles survenues dans les plaquettes sanguines ou bien dans le plasma ? Il est malheureusement impossible de conclure avec certitude à ce sujet. Une analyse du plasma des individus SXF avant/après traitement à la lovastatine serait nécessaire afin de répondre avec certitude à cette question. Une telle analyse pourrait faire l'objet d'un projet futur.

La prise concomitante de certains médicaments durant l'étude LovaX aurait pu influencer le protéome plaquettaire. Notamment, plus de la moitié des participants de l'étude LovaX prenaient des médicaments tel que des psychostimulants, des antipsychotiques atypiques, des inhibiteurs de la recapture de la sérotonine ou des antihypertenseurs. Il serait cependant étonnant que la prise de ces médicaments ait eu une influence significative sur nos résultats, puisqu'ils étaient pris de manière continue avant et durant l'étude LovaX et que chaque participant était comparé à lui-même. Donc, même s'ils avaient la capacité d'altérer le protéome plaquettaire, ces médicaments ne devraient pas influencer nos résultats de variation avant/après traitement à la lovastatine. Il est cependant possible que la prise sporadique d'anti-inflammatoires par nos participants ait affecté nos résultats protéomiques, puisque les AINS sont connus pour inhiber la COX et l'activité plaquettaire.

Outre la prise de médicaments, il est possible que des changements environnementaux aient pu altérer le protéome des individus durant l'étude. Des facteurs tels que l'alimentation et l'état de santé général pourraient avoir un effet sur les protéines dans les plaquettes et sont difficiles à contrôler dans le cadre d'une étude clinique. Tout compte fait, nous croyons que l'effet de tels facteurs n'est probablement pas significatif, puisque le nombre raisonnable de participants recrutés permet d'atténuer leur impact sur nos résultats.

4.3 Analyse des résultats de l'étude LovaC

L'étude LovaC réalisée en administrant de la lovastatine 40 mg PO DIE à des individus sains a globalement été un succès. D'abord, le suivi clinique et les prises de sang effectués auprès des participants a confirmé l'innocuité du traitement chez des individus avec un cholestérol normal. De plus, les caractéristiques démographiques des participants de l'étude LovaC (individus sains) sont très similaires à celles des participants de l'étude LovaX (individus SXF). Lorsque les analyses protéomiques des échantillons LovaC seront effectuées, on pourra donc comparer de manière fiable les résultats obtenus, sans se soucier que des facteurs externes soient responsables d'une réponse différente à la lovastatine.

Également, mentionnons que les participants ont eu une excellente observance au traitement (94%), et qu'ils n'ont pris que très peu d'autres médicaments durant l'étude. La prise de médicaments concomitants n'a généralement été que ponctuelle, de sorte que ces autres molécules devraient avoir peu d'impact sur nos résultats protéomiques. De plus, aucun des médicaments consommés par les participants n'a d'effet connu sur le protéome plaquettaire, hormis l'ibuprofène (pris par 5 participants) et le naproxen (pris par 1 participant). Bien que les AINS puissent avoir un effet sur le protéome, ces médicaments ont été pris de manière très sporadique durant l'étude. Il était malheureusement impossible de contrôler la prise de médicaments de nos participants avant leur enrôlement dans notre étude, mais il est probable que quelques-uns aient consommé des AINS avant d'être enrôlés dans notre protocole. Du coup, on peut présumer que le protéome pré-traitement (visite V0) et le protéome post-traitement de certains individus aurait été affecté par la prise d'anti-inflammatoires. Puisque nous effectuerons des analyses en comparant le protéome avant vs après traitement avec la lovastatine, la prise d'AINS avant et après traitement devraient mutuellement s'annuler lors de nos analyses. Somme toute, il est donc peu probable que la prise de médicaments concomitants ait eu un impact significatif sur le protéome plaquettaire du groupe d'individus à l'étude. De plus, puisque les plaquettes ont une durée de vie moyenne d'environ 7 à 10 jours, mais que les participants ont reçu la lovastatine durant une moyenne de 45 jours, toutes les plaquettes récoltées à la fin de l'étude ont hérité du protéome de mégacaryocytes exposés à la lovastatine. La durée du traitement est donc suffisante pour induire des modifications significatives dans toutes les plaquettes purifiées, ce qui facilite l'identification de biomarqueurs intéressants.

Enfin, de manière intéressante, on constate que la réponse du bilan lipidique à la lovastatine est différente chez les individus SXF et les individus sains. En effet, les individus SXF ont connu une diminution significative des triglycérides ($Md = -25,2\%$; $p = 0,005$), tandis que ce résultat n'a pas été reproduit lors de l'étude LovaC. Mentionnons qu'une telle diminution des triglycérides n'est pas non plus un effet usuel des statines et que ces médicaments sont cliniquement employés pour diminuer spécifiquement les LDL (« Lovastatin: Drug information - UpToDate », s. d.). Il est d'autant plus intéressant d'observer cette différence entre les deux cohortes, puisqu'une récente étude suggère des perturbations du bilan lipidique chez les individus avec SXF. Plus spécifiquement, les

individus SXF ont une diminution du LDL, du HDL et des triglycérides (Berry-Kravis *et al.*, 2015; Çaku *et al.*, 2017). Tel que suggéré par Çaku *et al.* (2017), une diminution des triglycérides chez les individus SXF recevant la lovastatine pourrait être expliquée par une activité diminuée de la PCSK9 chez ces individus. Cette protéine, impliquée dans l'élimination des récepteurs au LDL et au VLDL, pourrait avoir une activité anormale dans le SXF, ce qui provoquerait des anomalies du bilan lipidique (Çaku *et al.*, 2017).

4.4 Forces et limites de l'étude LovaC

De nombreuses forces peuvent être attribuées à l'étude LovaC ayant permis d'administrer de la lovastatine à des individus sains. D'abord, l'élaboration de notre protocole de recherche a permis de bien répondre aux objectifs que nous nous étions fixés : le nombre de participants recrutés a été adapté à notre budget et à nos contraintes temporelles, et le recrutement s'est effectué rapidement. De plus, les critères d'inclusion/exclusion n'ont pas été trop restrictifs et ont permis de sélectionner des candidats en santé. Enfin, soulignons que l'étude s'est déroulée de manière remarquablement efficace et dans le respect des normes éthiques les plus strictes. De plus, la congélation d'échantillons de plaquettes sanguines intactes a permis d'avoir en banque des échantillons pouvant être utilisés pour plusieurs projets futurs (voir section 5.2).

Quelques limites doivent être mentionnées au sujet de l'étude LovaC. Notamment, le nombre d'individus recrutés était faible, ce qui peut être une limitation importante dans l'identification de biomarqueurs protéomiques. De plus, en raison de notre budget de recherche limité, des coûts élevés des analyses LC-MS/MS et de la grande variabilité analytique inhérente à cette méthode, nous n'avons pas encore pu étudier le protéome des échantillons collectés durant cette étude. Les analyses à venir de ces échantillons sont décrites à la section 5.2.

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

5.1 Conclusion des travaux

Le présent travail s'inscrit dans une démarche visant à identifier des traitements efficaces pour les individus atteints du SXF. On imagine aisément que l'accès à un tel traitement pourrait s'avérer révolutionnaire, puisqu'il permettrait de radicalement transformer la vie des individus atteints et faciliterait le quotidien de leurs proches aidants. Bien qu'elle n'ait été étudiée en SXF que durant une petite étude ouverte, la lovastatine a un potentiel thérapeutique prometteur. Nos travaux suggèrent que la lovastatine pourrait induire des changements protéomiques spécifiques ou normalisant chez les individus SXF (ex : hexokinase-1). Bien que la spécificité de ces changements protéomiques doit être confirmée (voir section 5.2), nos résultats prometteurs confirment l'intérêt porté à la lovastatine pour le traitement du SXF, cette molécule semblant normaliser certains des processus biologiques pathologiques du SXF. De plus, certains des biomarqueurs potentiels identifiés durant notre étude pourraient potentiellement être employés lors d'études cliniques sur le SXF. En l'absence de mesures objectives de l'issue clinique, de tels biomarqueurs pourraient faciliter l'identification de médicaments capables de normaliser les processus cellulaires et les fonctions cognitives des individus SXF.

En conclusion, bien que les résultats de la présente étude soient préliminaires, ils sont porteurs d'espoir. Des recherches actuellement entreprises par notre laboratoire contribueront à valider et à élargir la portée des résultats ici présentés.

5.2 Perspectives futures

La présente étude a permis de révéler que la lovastatine semble moduler à la hausse ou à la baisse certaines protéines chez les individus SXF. Ces protéines sont un ensemble de biomarqueurs potentiellement très intéressants. Prochainement, notre laboratoire procèdera à des analyses par spectrométrie de masse MRM (*multiple reaction monitoring*) afin de confirmer la variation des protéines identifiées durant notre étude. Cette technique d'analyse extrêmement précise devrait permettre de confirmer avec confiance la validité des changements protéomiques induits par la lovastatine chez des individus SXF. Ensuite, grâce aux échantillons prélevés durant l'étude LovaC (auprès d'individus sains), une approche

MRM permettra de vérifier si les altérations protéomiques induites par la lovastatine sont spécifiques aux individus SXF. Au terme de ces analyses MRM, on disposera potentiellement d'une liste de biomarqueurs démontrant la capacité de la lovastatine à corriger des altérations physiopathologiques du SXF.

De tels biomarqueurs pourraient faire l'objet de nombreux projets prometteurs. Par exemple, nous pourrions éventuellement tenter d'identifier une corrélation entre l'expression de ces biomarqueurs et la sévérité clinique du SXF. De plus, nous pourrions possiblement établir une corrélation entre leur variabilité et la réponse à la lovastatine, ou même identifier de manière prédictive les individus pouvant répondre favorablement à ce traitement.

De plus, grâce au protocole de congélation des plaquettes développé durant notre projet LovaC, des échantillons de plaquettes avant/après traitement ont été mis en banque. Ces échantillons précieux ouvrent la porte à de nombreuses études prometteuses. Par exemple, des analyses de spectrométrie de masse avec digestion en solution pourraient être effectuées afin d'identifier d'autres biomarqueurs de réponse clinique et pour étudier la phosphorylation des protéines en réponse à la lovastatine. De plus, l'effet des statines sur le métabolome, le transcriptome et l'activité des plaquettes pourra être étudié grâce à ces échantillons.

En somme, mes travaux originaux ont pavé la voie à de multiples analyses supplémentaires, et s'inscrivent dans une démarche visant à améliorer le quotidien des individus atteints du SXF. Bien que cette maladie puisse provoquer un phénotype lourd de conséquences, les vastes recherches visant à leur venir en aide laissent entrevoir un avenir moins sombre.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Adinolfi, S., Ramos, A., Martin, S. R., Dal Piaz, F., Pucci, P., Bardoni, B., ... Pastore, A. (2003). The N-Terminus of the Fragile X Mental Retardation Protein Contains a Novel Domain Involved in Dimerization and RNA Binding. *Biochemistry*, 42(35), 10437-10444.
- Alberts, A. W., Chen, J., Kuron, G., Hunt, V., Huff, J., Hoffman, C., ... Harris, E. (1980). Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(7), 3957-3961.
- Ali, F. Y., Armstrong, P. C. J., Dhanji, A.-R. A., Tucker, A. T., Paul-Clark, M. J., Mitchell, J. A., & Warner, T. D. (2009). Antiplatelet Actions of Statins and Fibrates Are Mediated by PPARs. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(5), 706-711.
- Apotex Inc. (2014). Monographie de produit - Apo-Lovastatin.pdf.
- Ashley-Koch, A. E., Robinson, H., Glicksman, A. E., Nolin, S. L., Schwartz, C. E., Brown, W. T., ... Sherman, S. L. (1998). Examination of factors associated with instability of the FMR1 CGG repeat. *The American Journal of Human Genetics*, 63(3), 776-785.
- Asor, E. (2012). Platelets: A possible glance into brain biological processes in schizophrenia. *World Journal of Psychiatry*, 2(6), 124.
- Bagni, C., & Oostra, B. A. (2013). Fragile X syndrome: From protein function to therapy. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 161(11), 2809-2821.
- Bahou, W. F. (2012). Platelet systems biology using integrated genetic and proteomic platforms. *Thrombosis Research*, 129 Suppl 1, S38-45.
- Baier, P. C., Koch, J. M., Seeck-Hirschner, M., Ohlmeyer, K., Wilms, S., Aldenhoff, J. B., & Hinze-Selch, D. (2009). A flow-cytometric method to investigate glutamate-receptor-sensitivity in whole blood platelets – Results from healthy controls and patients with schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research*, 43(6), 585-591.
- Bailey, D. B., Hatton, D. D., Mesibov, G., Ament, N., & Skinner, M. (2000). Early development, temperament, and functional impairment in autism and fragile X syndrome. *Journal of autism and developmental disorders*, 30(1), 49-59.
- Banko, J. L. (2006). Regulation of Eukaryotic Initiation Factor 4E by Converging Signaling Pathways during Metabotropic Glutamate Receptor-Dependent Long-Term Depression. *Journal of Neuroscience*, 26(8), 2167-2173.
- Bear, M. F., Huber, K. M., & Warren, S. T. (2004). The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends in Neurosciences*, 27(7), 370-377.
- Berk, M., Plein, H., & Belsham, B. (2000). The specificity of platelet glutamate receptor supersensitivity in psychotic disorders. *Life sciences*, 66(25), 2427-2432.
- Berry-Kravis, E., Hessel, D., Coffey, S., Hervey, C., Schneider, A., Yuhas, J., ... Hagerman, R. (2009). A pilot open label, single dose trial of fenobam in adults with fragile X syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 46(4), 266-271.
- Berry-Kravis, E., Hessel, D., Rathmell, B., Zarevics, P., Cherubini, M., Walton-Bowen, K., ... Hagerman, R. J. (2012). Effects of STX209 (Arbaclofen) on Neurobehavioral

- Function in Children and Adults with Fragile X Syndrome: A Randomized, Controlled, Phase 2 Trial. *Science Translational Medicine*, 4(152), 152ra127.
- Berry-Kravis, E. (2002). Epilepsy in fragile X syndrome. *Developmental medicine and child neurology*, 44(11), 724–728.
- Berry-Kravis, E., & Ciurlionis, R. (1998). Overexpression of fragile X gene (FMR-1) transcripts increases cAMP production in neural cells. *Journal of neuroscience research*, 51(1), 41–48.
- Berry-Kravis, E., Des Portes, V., Hagerman, R., Jacquemont, S., Charles, P., Visootsak, J., ... von Raison, F. (2016). Mavoglurant in fragile X syndrome: Results of two randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *Science Translational Medicine*, 8(321), 321ra5.
- Berry-Kravis, E., Hessel, D., Abbeduto, L., Reiss, A. L., Beckel-Mitchener, A., & Urv, T. K. (2013). Outcome Measures for Clinical Trials in Fragile X Syndrome: *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics*, 34(7), 508–522.
- Berry-Kravis, E., Hicar, M., & Ciurlionis, R. (1995). Reduced cyclic AMP production in fragile X syndrome: cytogenetic and molecular correlations. *Pediatric research*, 38(5), 638.
- Berry-Kravis, E., Krause, S. E., Block, S. S., Guter, S., Wu, J., Leurgans, S., ... Salt, J. (2006). Effect of CX516, an AMPA-Modulating Compound, on Cognition and Behavior in Fragile X Syndrome: A Controlled Trial. *Journal of Child & Adolescent Psychopharmacology*, 16(5), 525–540.
- Berry-Kravis, E., Levin, R., Shah, H., Mathur, S., Darnell, J. C., & Ouyang, B. (2015). Cholesterol levels in Fragile X syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 167(2), 379–384.
- Berry-Kravis, E., & Sklensky, P. (1993). Demonstration of abnormal cyclic AMP production in platelets from patients with fragile X syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, 45(1), 81–87.
- Berry-Kravis, E., Sumis, A., Hervey, C., Nelson, M., Porges, S. W., Weng, N., ... Greenough, W. T. (2008). Open-label treatment trial of lithium to target the underlying defect in fragile X syndrome. *Journal of developmental & behavioral pediatrics*, 29(4), 293–302.
- Bilousova, T. V., Dansie, L., Ngo, M., Aye, J., Charles, J. R., Ethell, D. W., & Ethell, I. M. (2009). Minocycline promotes dendritic spine maturation and improves behavioural performance in the fragile X mouse model. *Journal of Medical Genetics*, 46(2), 94–102.
- Boyanova, D., Nilla, S., Birschmann, I., Dandekar, T., & Dittrich, M. (2012). PlateletWeb: a systems biologic analysis of signaling networks in human platelets. *Blood*, 119(3), e22–e34.
- Brackett, D. M., Qing, F., Amieux, P. S., Sellers, D. L., Horner, P. J., & Morris, D. R. (2013). Fmr1 Transcript Isoforms: Association with Polyribosomes; Regional and Developmental Expression in Mouse Brain. *PLoS ONE*, 8(3), e58296.
- Bradford, R. H. (1991). Expanded Clinical Evaluation of Lovastatin (EXCEL) study results. I. Efficacy in modifying plasma lipoproteins and adverse event profile in 8245 patients with moderate hypercholesterolemia. *Archives of Internal Medicine*, 151(1), 43–49.

- Broos, K., De Meyer, S. F., Feys, H. B., Vanhoorelbeke, K., & Deckmyn, H. (2012). Blood platelet biochemistry. *Thrombosis Research*, 129(3), 245-249.
- Bruni, F., Pasqui, A. L., Pastorelli, M., Bova, G., Cercignani, M., Palazzuoli, A., ... Puccetti, L. (2005). Different Effect of Statins on Platelet Oxidized-LDL Receptor (CD36 and LOX-1) Expression in Hypercholesterolemic Subjects. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 11(4), 417-428.
- Budimirovic, D. B., Bukelis, I., Cox, C., Gray, R. M., Tierney, E., & Kaufmann, W. E. (2006). Autism spectrum disorder in Fragile X syndrome: Differential contribution of adaptive socialization and social withdrawal. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 140A(17), 1814-1826.
- Burkhart, J. M., Vaudel, M., Gambaryan, S., Radau, S., Walter, U., Martens, L., ... Zahedi, R. P. (2012). The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood*, 120(15), e73-e82.
- Çaku, A., Pellerin, D., Bouvier, P., Riou, E., & Corbin, F. (2014). Effect of lovastatin on behavior in children and adults with fragile X syndrome: An open-label study. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 164(11), 2834-2842.
- Çaku, A., Seidah, N. G., Lortie, A., Gagné, N., Perron, P., Dubé, J., & Corbin, F. (2017). New insights of altered lipid profile in Fragile X Syndrome. *PLOS ONE*, 12(3), e0174301.
- Camacho, A., & Dimsdale, J. E. (2000). Platelets and Psychiatry: Lessons Learned From Old and New Studies. *Psychosomatic Medicine*, 62(3), 326-336.
- Cerqueira, N. M. F. S. A., Oliveira, E. F., Gesto, D. S., Santos-Martins, D., Moreira, C., Moorthy, H. N., ... Fernandes, P. A. (2016). Cholesterol Biosynthesis: A Mechanistic Overview. *Biochemistry*, 55(39), 5483-5506.
- Cha, J.-K., Jeong, M.-H., & Kim, J. W. (2004). Statin Reduce the Platelet P-Selectin Expression in Atherosclerotic Ischemic Stroke. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 18(1), 39-42.
- Choi, C. H., Schoenfeld, B. P., Weisz, E. D., Bell, A. J., Chambers, D. B., Hinchey, J., ... McBride, S. M. J. (2015). PDE-4 Inhibition Rescues Aberrant Synaptic Plasticity in Drosophila and Mouse Models of Fragile X Syndrome. *Journal of Neuroscience*, 35(1), 396-408.
- Choi, Catherine H., Schoenfeld, B. P., Bell, A. J., Hinchey, P., Kollaros, M., Gertner, M. J., ... McBride, S. M. J. (2011). Pharmacological reversal of synaptic plasticity deficits in the mouse model of Fragile X syndrome by group II mGluR antagonist or lithium treatment. *Brain Research*, 1380, 106-119.
- Chou, T.-C., Lin, Y.-F., Wu, W.-C., & Chu, K.-M. (2008). Enhanced nitric oxide and cyclic GMP formation plays a role in the anti-platelet activity of simvastatin: Simvastatin enhances NO formation in platelets. *British Journal of Pharmacology*, 153(6), 1281-1287.
- Coban, E., & Afacan, B. (2008). The effect of rosuvastatin treatment on the mean platelet volume in patients with uncontrolled primary dyslipidemia with hypolipidemic diet treatment. *Platelets*, 19(2), 111-114.

- Conn, P. J., & Pin, J.-P. (1997). PHARMACOLOGY AND FUNCTIONS OF METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTORS. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 37(1), 205-237.
- Corbin, F. (1997). The fragile X mental retardation protein is associated with poly(A)+ mRNA in actively translating polyribosomes. *Human Molecular Genetics*, 6(9), 1465-1472.
- Crabbe, L. S., Bensky, A. S., Hornstein, L., & Schwartz, D. C. (1993). Cardiovascular abnormalities in Children With Fragile X Syndrome. *Pediatrics*, 91(4), 714-715.
- Crocq, M.-A., & Guelfi, J. D. (2015). *DSM-5® : manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux*. Issy-les-Moulineaux : Elsevier Masson, [2015].
- Curia, G., Papouin, T., Séguéla, P., & Avoli, M. (2009). Downregulation of Tonic GABAergic Inhibition in a Mouse Model of Fragile X Syndrome. *Cerebral Cortex*, 19(7), 1515-1520.
- Dajani EZ, Shahwan TG, & Dajani NE. (2002). Statins platelets aggregation and coronary heart disease.pdf, 13(1), 27-31.
- Darnell, J. C., Mostovetsky, O., & Darnell, R. B. (2005). FMRP RNA targets: identification and validation. *Genes, Brain and Behavior*, 4(6), 341-349.
- Darnell, Jennifer C., Jensen, K. B., Jin, P., Brown, V., Warren, S. T., & Darnell, R. B. (2001). Fragile X Mental Retardation Protein Targets G Quartet mRNAs Important for Neuronal Function. *Cell*, 107(4), 489-499.
- Darnell, Jennifer C, & Klann, E. (2013). The translation of translational control by FMRP: therapeutic targets for FXS. *Nature Neuroscience*, 16(11), 1530-1536.
- Darnell, Jennifer C., Van Driesche, S. J., Zhang, C., Hung, K. Y. S., Mele, A., Fraser, C. E., ... Darnell, R. B. (2011). FMRP Stalls Ribosomal Translocation on mRNAs Linked to Synaptic Function and Autism. *Cell*, 146(2), 247-261.
- Davidovic, L., Bechara, E., Gravel, M., Jaglin, X. H., Tremblay, S., Sik, A., ... Khandjian, E. W. (2006). The nuclear MicroSpherule protein 58 is a novel RNA-binding protein that interacts with fragile X mental retardation protein in polyribosomal mRNPs from neurons. *Human Molecular Genetics*, 15(9), 1525-1538.
- de Vrij, F. M. S., Levenga, J., van der Linde, H. C., Koekkoek, S. K., De Zeeuw, C. I., Nelson, D. L., ... Willemsen, R. (2008). Rescue of behavioral phenotype and neuronal protrusion morphology in Fmr1 KO mice. *Neurobiology of Disease*, 31(1), 127-132.
- Devys, D., Lutz, Y., Rouyer, N., Belloq, J. P., & Mandel, J. L. (1993). The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. *Nature Genetics*, 4(4), 335-340.
- Dölen, G., & Bear, M. F. (2008). Role for metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) in the pathogenesis of fragile X syndrome: Pathogenesis of fragile X syndrome. *The Journal of Physiology*, 586(6), 1503-1508.
- Dölen, G., Carpenter, R. L., Ocain, T. D., & Bear, M. F. (2010). Mechanism-based approaches to treating fragile X. *Pharmacology & Therapeutics*, 127(1), 78-93.
- Dölen, G., Osterweil, E., Rao, B. S. S., Smith, G. B., Auerbach, B. D., Chattarji, S., & Bear, M. F. (2007). Correction of Fragile X Syndrome in Mice. *Neuron*, 56(6), 955-962.

- Du, H., Hu, H., Zheng, H., Hao, J., Yang, J., & Cui, W. (2014). Effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ in simvastatin antiplatelet activity: Influences on cAMP and mitogen-activated protein kinases. *Thrombosis Research*, 134(1), 111-120.
- Durand, V. M., & Carr, E. G. (1987). Social influences on « self-stimulatory » behavior: analysis and treatment application. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 20(2), 119-132.
- East C, Alivizatos PA, Grundy SM, Jones PH, & Farmer JA. (1988). Rhabdomyolysis in Patients Receiving Lovastatin after Cardiac Transplantation. *New England Journal of Medicine*, 318(1), 47-48.
- El Idrissi, A., Ding, X.-H., Scalia, J., Trenkner, E., Brown, W. T., & Dobkin, C. (2005). Decreased GABAA receptor expression in the seizure-prone fragile X mouse. *Neuroscience Letters*, 377(3), 141-146.
- El Idrissi, A., Neuwirth, L. S., & L'Amoreaux, W. (2010). Taurine regulation of short term synaptic plasticity in fragile X mice. *Journal of Biomedical Science*, 17(Suppl 1), S15.
- Erickson, C. A., Weng, N., Weiler, I. J., Greenough, W. T., Stigler, K. A., Wink, L. K., & McDougale, C. J. (2011). Open-label riluzole in fragile X syndrome. *Brain Research*, 1380, 264-270.
- Erickson, C. A., Wink, L. K., Ray, B., Early, M. C., Stieglmeyer, E., Mathieu-Frasier, L., ... McDougale, C. J. (2013). Impact of acamprosate on behavior and brain-derived neurotrophic factor: an open-label study in youth with fragile X syndrome. *Psychopharmacology*, 228(1), 75-84.
- Escolar, G., Krumwiede, M., & White, J. (1986). Organization of the actin cytoskeleton of resting and activated platelets in suspension. *Am J Pathol*, 123(1), 86-94.
- Fisch, G. S., Snow, K., Thibodeau, S. N., Chalifaux, M., Holden, J. J. A., Nelson, D. L., ... Maddalena, A. (1995). The Fragile X Premutation in Carriers and Its Effect on Mutation Size in Offspring. *Am. J. Hum. Genet.*, 56(5), 1147-1155.
- Freund, L. S., Reiss, A. L., & Abrams, M. T. (1993). Psychiatric Disorders Associated With Fragile X in the Young Female, 91(2), 321-329.
- Fu, Y.-H., Kuhl, D. P. A., Pizzuti, A., Pieretti, M., Sutcliffe, J. S., Richards, S., ... Caskey, C. T. (1991). Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: Resolution of the Sherman paradox. *Cell*, 67(6), 1047-1058.
- Gallagher, A., & Hallahan, B. (2012). Fragile X-associated disorders: a clinical overview. *Journal of Neurology*, 259(3), 401-413.
- Gantois, I., Pop, A. S., de Esch, C. E. F., Buijsen, R. A. M., Pooters, T., Gomez-Mancilla, B., ... Willemsen, R. (2013). Chronic administration of AFQ056/Mavoglurant restores social behaviour in Fmr1 knockout mice. *Behavioural Brain Research*, 239, 72-79.
- Gantois, I., Vandesompele, J., Speleman, F., Reyniers, E., D'Hooze, R., Severijnen, L.-A., ... Kooy, R. F. (2006). Expression profiling suggests underexpression of the GABAA receptor subunit δ in the fragile X knockout mouse model. *Neurobiology of Disease*, 21(2), 346-357.
- Geddis, A. E. (2010). Megakaryopoiesis. *Seminars in Hematology*, 47(3), 212-219.

- Gerber, U., Gee, C., & Benquet, P. (2007). Metabotropic glutamate receptors: intracellular signaling pathways. *Current Opinion in Pharmacology*, 7(1), 56-61.
- Godfrey, L. M., Erramouspe, J., & Cleveland, K. W. (2012). Teratogenic Risk of Statins in Pregnancy. *Annals of Pharmacotherapy*, 46(10), 1419-1424.
- Gross, C., Nakamoto, M., Yao, X., Chan, C.-B., Yim, S. Y., Ye, K., ... Bassell, G. J. (2010). Excess Phosphoinositide 3-Kinase Subunit Synthesis and Activity as a Novel Therapeutic Target in Fragile X Syndrome. *Journal of Neuroscience*, 30(32), 10624-10638.
- Hagerman, P. J., & Hagerman, R. J. (2004). The Fragile-X Premutation: A Maturing Perspective. *The American Journal of Human Genetics*, 74(5), 805-816.
- Hagerman, P. J., & Stafstrom, C. E. (2009). Origins of Epilepsy in Fragile X Syndrome. *Epilepsy Currents*, 9(4), 108-112.
- Hagerman, R. J., Van Housen, K., Smith, A. C. M., McGavran, L., & Opitz, J. M. (1984). Consideration of connective tissue dysfunction in the fragile X syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, 17(1), 111-121.
- Hamilton, P. K., Hughes, S. M. T., Plumb, R. D., Devine, A., Leahey, W., Lyons, K. S., ... McVeigh, G. E. (2010). Statins have beneficial effects on platelet free radical activity and intracellular distribution of GTPases in hyperlipidaemia. *Clinical Science*, 118(5), 359-366.
- Harris, S. W., Hessel, D., Goodlin-Jones, B., Ferranti, J., Bacalman, S., Barbato, I., ... Hagerman, R. J. (2008). Autism Profiles of Males With Fragile X Syndrome. *American Journal on Mental Retardation*, 113(6), 427-438.
- Hatton, D. D., Buckley, E., Lachiewicz, A., & Roberts, J. (1998). Ocular status of boys with fragile X syndrome: A prospective study. *Journal of American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus*, 2(5), 298-302.
- Henderson, C., Wijetunge, L., Kinoshita, M. N., Shumway, M., Hammond, R. S., Postma, F. R., ... Healy, A. M. (2012). Reversal of Disease-Related Pathologies in the Fragile X Mouse Model by Selective Activation of GABAB Receptors with Arbaclofen. *Science Translational Medicine*, 4(152), 152ra128.
- Hersh, J. H., Saul, R. A., & Committee on Genetics. (2011). Health Supervision for Children With Fragile X Syndrome. *Pediatrics*, 127(5), 994-1006.
- Hessel, D., Nguyen, D. V., Green, C., Chavez, A., Tassone, F., Hagerman, R. J., ... Hall, S. (2009). A solution to limitations of cognitive testing in children with intellectual disabilities: the case of fragile X syndrome. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, 1(1), 33-45.
- Heulens, I., D'Hulst, C., Van Dam, D., De Deyn, P. P., & Kooy, R. F. (2012). Pharmacological treatment of fragile X syndrome with GABAergic drugs in a knockout mouse model. *Behavioural Brain Research*, 229(1), 244-249.
- Hochgraf, E., Levy, Y., Aviram, M., Brook, J. G., & Cogan, U. (1994). Lovastatin decreases plasma and platelet cholesterol levels and normalizes elevated platelet fluidity and aggregation in hypercholesterolemic patients. *Metabolism*, 43(1), 11-17.
- Hoeffler, C. A., Sanchez, E., Hagerman, R. J., Mu, Y., Nguyen, D. V., Wong, H., ... Tassone, F. (2012). Altered mTOR signaling and enhanced CYFIP2 expression levels in subjects with fragile X syndrome. *Genes, Brain and Behavior*, 11(3), 332-341.

- Hoffbrand, A. V., & Moss, P. a. H. (2016). *Hoffbrand's essential haematology*. Chichester, West Sussex : Wiley Blackwell, 2016.
- Hou, L., Antion, M. D., Hu, D., Spencer, C. M., Paylor, R., & Klann, E. (2006). Dynamic Translational and Proteasomal Regulation of Fragile X Mental Retardation Protein Controls mGluR-Dependent Long-Term Depression. *Neuron*, 51(4), 441-454.
- Hu, H., Qin, Y., Bochorishvili, G., Zhu, Y., van Aelst, L., & Zhu, J. J. (2008). Ras Signaling Mechanisms Underlying Impaired GluR1-Dependent Plasticity Associated with Fragile X Syndrome. *Journal of Neuroscience*, 28(31), 7847-7862.
- Huhle, G., Abletshauser, C., Mayer, N., Weidinger, G., Harenberg, J., & Heene, D. . (1999). Reduction of Platelet Activity Markers in Type II Hypercholesterolemic Patients by a HMG-CoA-Reductase Inhibitor. *Thrombosis Research*, 95(5), 229-234.
- Hunter, R. W., MacKintosh, C., & Hers, I. (2009). Protein Kinase C-mediated Phosphorylation and Activation of PDE3A Regulate cAMP Levels in Human Platelets. *Journal of Biological Chemistry*, 284(18), 12339-12348.
- Irwin, S. A. (2000). Dendritic Spine Structural Anomalies in Fragile-X Mental Retardation Syndrome. *Cerebral Cortex*, 10(10), 1038-1044.
- Irwin, Scott A., Patel, B., Idupulapati, M., Harris, J. B., Crisostomo, R. A., Larsen, B. P., ... Greenough, W. T. (2001). Abnormal dendritic spine characteristics in the temporal and visual cortices of patients with fragile-X syndrome: A quantitative examination. *American Journal of Medical Genetics*, 98(2), 161-167.
- Jacquemont, S., Curie, A., des Portes, V., Torrioli, M. G., Berry-Kravis, E., Hagerman, R. J., ... Gomez-Mancilla, B. (2011). Epigenetic Modification of the FMR1 Gene in Fragile X Syndrome Is Associated with Differential Response to the mGluR5 Antagonist AFQ056. *Science Translational Medicine*, 3(64), 64ra1.
- Janusz, A., Milek, J., Perycz, M., Pacini, L., Bagni, C., Kaczmarek, L., & Dziembowska, M. (2013). The Fragile X Mental Retardation Protein Regulates Matrix Metalloproteinase 9 mRNA at Synapses. *Journal of Neuroscience*, 33(46), 18234-18241.
- Kaczmarek, D., Hohlfeld, T., Wambach, G., & Schrör, K. (1993). The actions of lovastatin on platelet function and platelet eicosanoid receptors in type II hypercholesterolaemia: A double-blind, placebo-controlled, prospective study. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 45(5), 451-457.
- Kaneider, N. C. (2002). Rho-GTPase-Dependent Platelet-Neutrophil Interaction Affected by HMG-CoA Reductase Inhibition With Altered Adenosine Nucleotide Release and Function. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(6), 1029-1035.
- Kanellopoulos, A. K., Semelidou, O., Kotini, A. G., Anezaki, M., & Skoulakis, E. M. C. (2012). Learning and Memory Deficits Consequent to Reduction of the Fragile X Mental Retardation Protein Result from Metabotropic Glutamate Receptor-Mediated Inhibition of cAMP Signaling in Drosophila. *Journal of Neuroscience*, 32(38), 13111-13124.
- Kelley, D., Bhattacharyya, A., Lahvis, G., Yin, J., Malter, J., & Davidson, R. (2008). The cyclic AMP phenotype of fragile X and autism. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32(8), 1533-1543.

- Kelley, D. J., Davidson, R. J., Elliott, J. L., Lahvis, G. P., Yin, J. C. P., & Bhattacharyya, A. (2007). The Cyclic AMP Cascade Is Altered in the Fragile X Nervous System. *PLoS ONE*, 2(9), e931.
- Kidd, S. A., Lachiewicz, A., Barbouth, D., Blitz, R. K., Delahunty, C., McBrien, D., ... Berry-Kravis, E. (2014). Fragile X Syndrome: A Review of Associated Medical Problems. *PEDIATRICS*, 134(5), 995-1005.
- Kim, M., Bellini, M., & Ceman, S. (2009). Fragile X Mental Retardation Protein FMRP Binds mRNAs in the Nucleus. *Molecular and Cellular Biology*, 29(1), 214-228.
- Kim, S. H., Markham, J. A., Weiler, I. J., & Greenough, W. T. (2008). Aberrant early-phase ERK inactivation impedes neuronal function in fragile X syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(11), 4429-4434.
- Klann, E., & Dever, T. E. (2004). Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(12), 931-942.
- Klockenbusch, C., Walsh, G. M., Brown, L. M., Hoffman, M. D., Ignatchenko, V., Kislinger, T., & Kast, J. (2014). Global Proteome Analysis Identifies Active Immunoproteasome Subunits in Human Platelets. *Molecular & Cellular Proteomics*, 13(12), 3308-3319.
- Kolch, W. (2005). Coordinating ERK/MAPK signaling through scaffolds and inhibitors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(11), 827-837.
- Kronk, R., Bishop, E. E., Raspa, M., Bickel, J. O., Mandel, D. A., & Bailey, D. B. (2010). Prevalence, Nature, and Correlates of Sleep Problems Among Children with Fragile X Syndrome Based on a Large Scale Parent Survey. *Sleep*, 33(5), 679-687.
- Kucera, M., Balaz, D., Kruzliak, P., Ciccocioppo, R., Oravec, S., Rodrigo, L., ... Gaspar, L. (2015). The effects of atorvastatin treatment on the mean platelet volume and red cell distribution width in patients with dyslipoproteinemia and comparison with plasma atherogenicity indicators—A pilot study. *Clinical Biochemistry*, 48(9), 557-561.
- Kumari, D., Bhattacharya, A., Nadel, J., Moulton, K., Zeak, N. M., Glicksman, A., ... Usdin, K. (2014). Identification of Fragile X Syndrome Specific Molecular Markers in Human Fibroblasts: A Useful Model to Test the Efficacy of Therapeutic Drugs. *Human Mutation*, 35(12), 1485-1494.
- Kumari, R., Castillo, C., & Francesconi, A. (2013). Agonist-dependent Signaling by Group I Metabotropic Glutamate Receptors Is Regulated by Association with Lipid Domains. *Journal of Biological Chemistry*, 288(44), 32004-32019.
- Lachiewicz, A. M., Dawson, D. V., & Spiridigliozzi, G. A. (2000). Physical characteristics of young boys with fragile X syndrome: Reasons for difficulties in making a diagnosis in young males. *American Journal of Medical Genetics*, 92(4), 229-236.
- Laufs, U., Gertz, K., Huang, P., Nickenig, G., Bohm, M., Dirnagl, U., & Endres, M. (2000). Atorvastatin Upregulates Type III Nitric Oxide Synthase in Thrombocytes, Decreases Platelet Activation, and Protects From Cerebral Ischemia in Normocholesterolemic Mice, *Stroke*, 31(10), 2442 - 2449.
- Lee, Y.-M., Chen, W.-F., Chou, D.-S., Jayakumar, T., Hou, S.-Y., Lee, J.-J., ... Sheu, J.-R. (2010). Cyclic nucleotides and mitogen-activated protein kinases: regulation of simvastatin in platelet activation. *Journal of Biomedical Science*, 17(1).
- Leigh, M. J. S., Nguyen, D. V., Mu, Y., Winarni, T. I., Schneider, A., Chechi, T., ... Hagerman, R. J. (2013). A Randomized Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of

- Minocycline in Children and Adolescents with Fragile X Syndrome: *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics*, 34(3), 147-155.
- Lemonnier, E., Robin, G., Degrez, C., Tyzio, R., Grandgeorge, M., & Ben-Ari, Y. (2013). Treating Fragile X syndrome with the diuretic bumetanide: a case report. *Acta Paediatrica*, 102(6), e288-e290.
- Lessard, M., Chouiali, A., Drouin, R., Sébire, G., & Corbin, F. (2012). Quantitative measurement of FMRP in blood platelets as a new screening test for fragile X syndrome. *Clinical Genetics*, 82(5), 472-477.
- Levenga, J., Hayashi, S., de Vrij, F. M. S., Koekkoek, S. K., van der Linde, H. C., Nieuwenhuizen, I., ... Oostra, B. A. (2011). AFQ056, a new mGluR5 antagonist for treatment of fragile X syndrome. *Neurobiology of Disease*, 42(3), 311-317.
- Li, Z., Delaney, M. K., O'Brien, K. A., & Du, X. (2010). Signaling During Platelet Adhesion and Activation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(12), 2341-2349.
- Ligsay, A., Van Dijck, A., Nguyen, D. V., Lozano, R., Chen, Y., Bickel, E. S., ... Hagerman, R. J. (2017). A randomized double-blind, placebo-controlled trial of ganaxolone in children and adolescents with fragile X syndrome. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, 9(1).
- Lijnen, P., Echevaría-Vázquez, D., & Petrov, V. (1996). Influence of cholesterol-lowering on plasma membrane lipids and function. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 18(2), 123-136.
- Lisik, M. (2017). Health problems in females carriers of premutation in the FMR1 gene. *Psychiatria Polska*, 51(5), 899-907.
- Lovastatin: Drug information - UpToDate. (s. d.). Consulté 15 avril 2018, à l'adresse https://www.uptodate.com/contents/lovastatin-drug-information?search=lovastatin&source=search_result&selectedTitle=1~103&usage_type=default&display_rank=1
- Luzak, B., Boncler, M., Rywaniak, J., Wilk, R., Stanczyk, L., Czyz, M., ... Watala, C. (2011). The effect of a platelet cholesterol modulation on the acetylsalicylic acid-mediated blood platelet inhibition in hypercholesterolemic patients. *European Journal of Pharmacology*, 658(2-3), 91-97.
- Maddalena, A., Richards, C. S., McGinniss, M. J., Brothman, A., Desnick, R. J., Grier, R. E., ... Wolff, D. J. (2001). Technical Standards and Guidelines for Fragile X: The First of a Series of Disease-Specific Supplements to the Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories of the American College of Medical Genetics. *Genetics in Medicine*, 3(3), 200-205.
- Mandel, J. L., & Biancalana, V. (2004). Fragile X mental retardation syndrome: from pathogenesis to diagnostic issues. *Growth Hormone & IGF Research*, 14, 158-165.
- Marakasova, E. S., Akhmatova, N. K., Amaya, M., Eisenhaber, B., Eisenhaber, F., van Hoek, M. L., & Baranova, A. V. (2013). Prenylation: From bacteria to eukaryotes. *Molecular Biology*, 47(5), 622-633.
- Marwali, M. R., Hu, C.-P., Mohandas, B., Dandapat, A., Deonikar, P., Chen, J., ... Mehta, J. L. (2007). Modulation of ADP-Induced Platelet Activation by Aspirin and Pravastatin: Role of Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1,

- Nitric Oxide, Oxidative Stress, and Inside-Out Integrin Signaling. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 322(3), 1324-1332.
- Masu, M., Tanabe, Y., Tsuchida, K., Shigemoto, R., & Nakanishi, S. (1991). Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature*, 349(6312), 760-765.
- Maurer-Spurej, E., Kahr, W. H., Carter, C. J., Pittendreigh, C., Cameron, M., & Cyr, T. D. (2008). The value of proteomics for the diagnosis of a platelet-related bleeding disorder. *Platelets*, 19(5), 342-351.
- McCoy, M., & Corbin, F. (2015). *Fonctions globales de FMRP dans la différenciation cellulaire dans un modèle non-neuronal: le MEG-01*. Université de Sherbrooke.
- McBride, S. M. J., Choi, C. H., Wang, Y., Liebelt, D., Braunstein, E., Ferreiro, D., ... Jongens, T. A. (2005). Pharmacological Rescue of Synaptic Plasticity, Courtship Behavior, and Mushroom Body Defects in a Drosophila Model of Fragile X Syndrome. *Neuron*, 45(5), 753-764.
- McConkie-Rosell, A., Finucane, B., Cronister, A., Abrams, L., Bennett, R. L., & Pettersen, B. J. (2005). Genetic Counseling for Fragile X Syndrome: Updated Recommendations of the National Society of Genetic Counselors. *Journal of Genetic Counseling*, 14(4), 249-270.
- McCoy, M., Poliquin-Duchesneau, D., & Corbin, F. (2016). Molecular dynamics of FMRP and other RNA-binding proteins in MEG-01 differentiation: the role of mRNP complexes in non-neuronal development. *Biochemistry and Cell Biology*, 94(6), 597-608.
- Mi, H., Muruganujan, A., & Thomas, P. D. (2012). PANTHER in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D377-D386.
- Michalon, A., Sidorov, M., Ballard, T. M., Ozmen, L., Spooren, W., Wettstein, J. G., ... Lindemann, L. (2012). Chronic Pharmacological mGlu5 Inhibition Corrects Fragile X in Adult Mice. *Neuron*, 74(1), 49-56.
- Michelson, A. D. (2007). *Platelets*. Amsterdam ; Boston : Academic Press/Elsevier, c2007.
- Milà, M., Rodriguez-Revena, L., & Matilla-Dueñas, A. (2016). FMR1 Premutation: Basic Mechanisms and Clinical Involvement. *The Cerebellum*, 15(5), 543-545.
- Molins, B., Pena, E., Padro, T., Casani, L., Mendieta, C., & Badimon, L. (2010). Glucose-Regulated Protein 78 and Platelet Deposition: Effect of Rosuvastatin. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(6), 1246-1252.
- Moscardó, A., Vallés, J., Latorre, A., Madrid, I., & Santos, M. T. (2013). Reduction of platelet cytosolic phospholipase A2 activity by atorvastatin and simvastatin: Biochemical regulatory mechanisms. *Thrombosis Research*, 131(4), e154-e159.
- Narayanan, U., Nalavadi, V., Nakamoto, M., Thomas, G., Ceman, S., Bassell, G. J., & Warren, S. T. (2008). S6K1 Phosphorylates and Regulates Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP) with the Neuronal Protein Synthesis-dependent Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Signaling Cascade. *Journal of Biological Chemistry*, 283(27), 18478-18482.
- Nesvizhskii, A. I., Keller, A., Kolker, E., & Aebersold, R. (2003). A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 75(17), 4646-4658.

- Niswender, C. M., & Conn, P. J. (2010). Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 50(1), 295-322.
- Niu, M., Han, Y., Dy, A. B. C., Du, J., Jin, H., Qin, J., ... Hagerman, R. J. (2017). Autism Symptoms in Fragile X Syndrome. *Journal of Child Neurology*, 32(10), 903-909.
- Nolin, S. L., Brown, W. T., Glicksman, A., Houck, Jr., G. E., Gargano, A. D., Sullivan, A., ... Sherman, S. L. (2003). Expansion of the Fragile X CGG Repeat in Females with Premutation or Intermediate Alleles. *The American Journal of Human Genetics*, 72(2), 454-464.
- Nomura, S., Shouzu, A., Omoto, S., Inami, N., Shimazu, T., Satoh, D., ... Iwasaka, T. (2009). Effects of pitavastatin on monocyte chemoattractant protein-1 in hyperlipidemic patients: *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 20(6), 440-447.
- Novelli, G., & D'Apice, M. R. (2012). Protein farnesylation and disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 35(5), 917-926.
- Nussbaum, R. L., McInnes, R. R., & Willard, H. F. (2016). *Thompson & Thompson genetics in medicine*. Philadelphia, PA : Elsevier/Saunders, [2016].
- Ogawa, M. (1993). Differentiation and Proliferation of Hematopoietic Stem Cells. *Blood*, 81(11), 2844-2853.
- Olmos-Serrano, J. L., Paluszkiwicz, S. M., Martin, B. S., Kaufmann, W. E., Corbin, J. G., & Huntsman, M. M. (2010). Defective GABAergic Neurotransmission and Pharmacological Rescue of Neuronal Hyperexcitability in the Amygdala in a Mouse Model of Fragile X Syndrome. *Journal of Neuroscience*, 30(29), 9929-9938.
- Osterweil, E. K., Krueger, D. D., Reinhold, K., & Bear, M. F. (2010). Hypersensitivity to mGluR5 and ERK1/2 Leads to Excessive Protein Synthesis in the Hippocampus of a Mouse Model of Fragile X Syndrome. *Journal of Neuroscience*, 30(46), 15616-15627.
- Osterweil, Emily K., Chuang, S.-C., Chubykin, A. A., Sidorov, M., Bianchi, R., Wong, R. K. S., & Bear, M. F. (2013). Lovastatin Corrects Excess Protein Synthesis and Prevents Epileptogenesis in a Mouse Model of Fragile X Syndrome. *Neuron*, 77(2), 243-250.
- Owens, A., & Mackman, N. (2014). The Antithrombotic Effects of Statins. *Annual Review of Medicine*, 65(1), 433-445.
- Pacey, L. K. K., Heximer, S. P., & Hampson, D. R. (2009). Increased GABAB Receptor-Mediated Signaling Reduces the Susceptibility of Fragile X Knockout Mice to Audiogenic Seizures. *Molecular Pharmacology*, 76(1), 18-24.
- Paribello, C., Tao, L., Folino, A., Berry-Kravis, E., Tranfaglia, M., Ethell, I. M., & Ethell, D. W. (2010). Open-label add-on treatment trial of minocycline in fragile X syndrome. *BMC Neurology*, 10(1).
- Park, S., Park, J. M., Kim, S., Kim, J.-A., Shepherd, J. D., Smith-Hicks, C. L., ... Worley, P. F. (2008). Elongation Factor 2 and Fragile X Mental Retardation Protein Control the Dynamic Translation of Arc/Arg3.1 Essential for mGluR-LTD. *Neuron*, 59(1), 70-83.
- Pawelczyk, M., Chmielewski, H., Kaczorowska, B., Przybyła, M., & Baj, Z. (2013). The influence of statin therapy on platelet activity markers in hyperlipidemic patients after ischemic stroke. *Archives of Medical Science*, 1, 115-121.

- Pellerin, D., Çaku, A., Fradet, M., Bouvier, P., Dubé, J., & Corbin, F. (2016). Lovastatin corrects ERK pathway hyperactivation in fragile X syndrome: potential of platelet's signaling cascades as new outcome measures in clinical trials. *Biomarkers*, 21(6), 497-508.
- Peprah, E. (2012). Fragile X Syndrome: The FMR1 CGG Repeat Distribution Among World Populations: FMR1 Prevalence in World Populations. *Annals of Human Genetics*, 76(2), 178-191.
- Phipps, R. P., & Blumberg, N. (2009). Statin Islands and PPAR Ligands in Platelets. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(5), 620-621.
- Pietrobono, R., Tabolacci, E., Zalfa, F., Zito, I., Terracciano, A., Moscato, U., ... Neri, G. (2005). Molecular dissection of the events leading to inactivation of the FMR1 gene. *Human Molecular Genetics*, 14(2), 267-277.
- Pignatelli, P., Carnevale, R., Pastori, D., Cangemi, R., Napoleone, L., Bartimoccia, S., ... Violi, F. (2012a). Immediate Antioxidant and Antiplatelet Effect of Atorvastatin via Inhibition of Nox2. *Circulation*, 126(1), 92-103.
- Pignatelli, P., Sanguigni, V., Lenti, L., Loffredo, L., Carnevale, R., Sorge, R., & Violi, F. (2007). Oxidative stress-mediated platelet CD40 ligand upregulation in patients with hypercholesterolemia: effect of atorvastatin. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5(6), 1170-1178.
- Pignatelli, P., Carnevale, R., Di Santo, S., Bartimoccia, S., Nocella, C., Vicario, T., ... Violi, F. (2012b). Rosuvastatin reduces platelet recruitment by inhibiting NADPH oxidase activation. *Biochemical Pharmacology*, 84(12), 1635-1642.
- Plante, I., Davidovic, L., Ouellet, D. L., Gobeil, L.-A., Tremblay, S., Khandjian, E. W., & Provost, P. (2006). Dicer-Derived MicroRNAs Are Utilized by the Fragile X Mental Retardation Protein for Assembly on Target RNAs. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2006(4).
- Pop, A. S., Levenga, J., de Esch, C. E. F., Buijsen, R. A. M., Nieuwenhuizen, I. M., Li, T., ... Willemsen, R. (2014). Rescue of dendritic spine phenotype in Fmr1 KO mice with the mGluR5 antagonist AFQ056/Mavoglurant. *Psychopharmacology*, 231(6), 1227-1235.
- Porter, F. D., & Herman, G. E. (2011). Malformation syndromes caused by disorders of cholesterol synthesis. *Journal of Lipid Research*, 52(1), 6-34.
- Pretto, D., Yrigollen, C. M., Tang, H.-T., Williamson, J., Espinal, G., Iwahashi, C. K., ... Tassone, F. (2014). Clinical and molecular implications of mosaicism in FMR1 full mutations. *Frontiers in Genetics*, 5(318).
- Price, T. J., Rashid, M. H., Millicamps, M., Sanoja, R., Entrena, J. M., & Cervero, F. (2007). Decreased nociceptive sensitization in mice lacking the fragile X mental retardation protein: role of mGluR1/5 and mTOR. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(51), 13958-13967.
- Puccetti, L., Pasqui, A. L., Pastorelli, M., Bova, G., Cercignani, M., Palazzuoli, A., ... Bruni, F. (2002). Time-dependent effect of statins on platelet function in hypercholesterolaemia. *European Journal of Clinical Investigation*, 32(12), 901-908.
- Puccetti, L., Sawamura, T., Pasqui, A. L., Pastorelli, M., Auteri, A., & Bruni, F. (2005). Atorvastatin reduces platelet-oxidized-LDL receptor expression in

- hypercholesterolaemic patients. *European Journal of Clinical Investigation*, 35(1), 47-51.
- Qureshi, A. H., Chaoji, V., Maiguel, D., Faridi, M. H., Barth, C. J., Salem, S. M., ... Gupta, V. (2009). Proteomic and phospho-proteomic profile of human platelets in basal, resting state: insights into integrin signaling. *PloS One*, 4(10), e7627.
- Rajan-Babu, I.-S., & Chong, S. (2016). Molecular Correlates and Recent Advancements in the Diagnosis and Screening of FMR1-Related Disorders. *Genes*, 7(10), e87.
- Ramos, J. W. (2008). The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(12), 2707-2719.
- Raslova, H. (2003). Megakaryocyte polyploidization is associated with a functional gene amplification. *Blood*, 101(2), 541-544. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-05-1553>
- Reed, G. L. (2004). Platelet secretory mechanisms. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 30(4), 441-450.
- Rogers, S. J., Wehner, E. A., & Hagerman, R. (2001). The Behavioral Phenotype in Fragile X: Symptoms of Autism in Very Young Children with Fragile X Syndrome, Idiopathic Autism, and Other Developmental Disorders: *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics*, 22(6), 409-417.
- Rousseau, F., Heitz, D., Tarleton, J., MacPherson, J., Mathew, C., Schorderet, D. F., ... Mandel, J. L. (1994). A Multicenter Study on Genotype-Phenotype Correlations in the Fragile X Syndrome, Using Direct Diagnosis with Probe StB 12.3: The First 2,253 Cases. *Am. J. Hum. Genet.*, 55(2), 225-237.
- Ru, Y.-X., Dong, S.-X., Liang, H., & Zhao, S.-X. (2016). Platelet production of megakaryocyte: A review with original observations on human *in vivo* cells and bone marrow. *Ultrastructural Pathology*, 40(4), 163-170.
- Rueda, J.-R., Guillén, V., Ballesteros, J., Tejada, M.-I., & Solà, I. (2015). L-acetylcarnitine for treating fragile X syndrome. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- Sandoz Canada Inc. (2014). Monographie de produit - Sandoz Lovastatin.pdf.
- Sanguigni, V. (2005). Short-Term Treatment With Atorvastatin Reduces Platelet CD40 Ligand and Thrombin Generation in Hypercholesterolemic Patients. *Circulation*, 111(4), 412-419.
- Santoro, M. R., Bray, S. M., & Warren, S. T. (2012). Molecular Mechanisms of Fragile X Syndrome: A Twenty-Year Perspective. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 7(1), 219-245.
- Saul, R. A., & Tarleton, J. C. (2012). FMR1-Related Disorders. In M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. Bean, K. Stephens, & A. Amemiya (Éd.), *GeneReviews®*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. Consulté à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1384/>
- Schafer, A. (2005). Rosuvastatin Reduces Platelet Activation in Heart Failure: Role of NO Bioavailability. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(5), 1071-1077.
- Selvadurai, M. V., & Hamilton, J. R. (2018). Structure and function of the open canalicular system – the platelet's specialized internal membrane network. *Platelets*, 29(4), 319 - 325.

- Stach, K., Duc Nguyen, X., Lang, S., Elmas, E., Weiß, C., Borggreffe, M., ... Kälisch, T. (2012). Simvastatin and atorvastatin attenuate VCAM-1 and uPAR expression on human endothelial cells and platelet surface expression of CD40 ligand. *Cardiology Journal*, 19(1), 20-28.
- Steward, O., & Schuman, E. M. (2003). Compartmentalized Synthesis and Degradation of Proteins in Neurons. *Neuron*, 40(2), 347-359.
- Stone, N. J., Robinson, J. G., Lichtenstein, A. H., Bairey Merz, C. N., Blum, C. B., Eckel, R. H., ... Wilson, P. W. F. (2014). 2013 ACC/AHA Guideline on the Treatment of Blood Cholesterol to Reduce Atherosclerotic Cardiovascular Risk in Adults. *Journal of the American College of Cardiology*, 63(25), 2889-2934.
- Tamanini, F., Bontekoe, C., Bakker, C. E., van Unen, L., Anar, B., Willemsen, R., ... Hoogeveen, A. T. (1999). Different Targets for the Fragile X-Related Proteins Revealed by Their Distinct Nuclear Localizations. *Human Molecular Genetics*, 8(5), 863-869.
- Tavares, C. D. J., Ferguson, S. B., Giles, D. H., Wang, Q., Wellmann, R. M., O'Brien, J. P., ... Dalby, K. N. (2014). The Molecular Mechanism of Eukaryotic Elongation Factor 2 Kinase Activation. *Journal of Biological Chemistry*, 289(34), 23901-23916.
- Thomas, P. D. (2003). PANTHER: A Library of Protein Families and Subfamilies Indexed by Function. *Genome Research*, 13(9), 2129-2141.
- Tsai, N.-W., Lin, T.-K., Chang, W.-N., Jan, C.-R., Huang, C.-R., Chen, S.-D., ... Lu, C.-H. (2011). Statin pre-treatment is associated with lower platelet activity and favorable outcome in patients with acute non-cardio-embolic ischemic stroke. *Critical Care*, 15(4), R163.
- Tsiouris, J. A., & Brown, W. T. (2004). Neuropsychiatric Symptoms of Fragile X Syndrome: Pathophysiology and Pharmacotherapy. *CNS Drugs*, 18(11), 687-703.
- Van Esch, H. (2006). The Fragile X premutation: new insights and clinical consequences. *European Journal of Medical Genetics*, 49(1), 1-8.
- Vasawala, H., Kavalipati, N., Shah, J., & Ramakrishnan, A. (2015). Pleiotropic effects of statins. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 19(5), 554 - 562.
- Verheij, C., Bakker, C. E., de Graaff, E., Keulemans, J., Willemsen, R., Verkerk, A. J., ... Oostra, B. A. (1993). Characterization and localization of the FMR-1 gene product associated with fragile X syndrome. *Nature*, 363(6431), 722-724.
- Verkerk, A. J., Pieretti, M., Sutcliffe, J. S., Fu, Y. H., Kuhl, D. P., Pizzuti, A., ... Zhang, F. P. (1991). Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*, 65(5), 905-914.
- Visootsak, J., Warren, S. T., Anido, A., & Graham, J. M. (2005). Fragile X Syndrome: An Update and Review for the Primary Pediatrician. *Clinical Pediatrics*, 44(5), 371-381.
- Wang, H. (2014). Lipid rafts: a signaling platform linking cholesterol metabolism to synaptic deficits in autism spectrum disorders. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8.
- Wang, X., Snape, M., Klann, E., Stone, J. G., Singh, A., Petersen, R. B., ... Zhu, X. (2012). Activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway contributes to the behavioral deficit of fragile x-syndrome: ERK activation in FXS. *Journal of Neurochemistry*, 121(4), 672-679.

- Weng, N., Weiler, I. J., Sumis, A., Berry-Kravis, E., & Greenough, W. T. (2008). Early-phase ERK activation as a biomarker for metabolic status in fragile X syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 147B(7), 1253-1257.
- Wheeler, A., Raspa, M., Hagerman, R., Mailick, M., & Riley, C. (2017). Implications of the *FMR1* Premutation for Children, Adolescents, Adults, and Their Families. *Pediatrics*, 139(Supplement 3), S172-S182.
- White, J. G., & Krumwiede, M. (1987). Further studies of the secretory pathway in thrombin-stimulated human platelets. *Blood*, 69(4), 1196-1203.
- Winkler, W., Zellner, M., Diestinger, M., Babeluk, R., Marchetti, M., Goll, A., ... Oehler, R. (2008). Biological Variation of the Platelet Proteome in the Elderly Population and Its Implication for Biomarker Research. *Molecular & Cellular Proteomics*, 7(1), 193 - 203.
- Xiao, H., Chen, W., Tang, G. X., Smeekens, J. M., & Wu, R. (2015). Systematic Investigation of Cellular Response and Pleiotropic Effects in Atorvastatin-Treated Liver Cells by MS-Based Proteomics. *Journal of Proteome Research*, 14(3), 1600-1611.
- Yan, Q. J., Rammal, M., Tranfaglia, M., & Bauchwitz, R. P. (2005). Suppression of two major Fragile X Syndrome mouse model phenotypes by the mGluR5 antagonist MPEP. *Neuropharmacology*, 49(7), 1053-1066.
- Yokoyama, S., Ikeda, H., Haramaki, N., Yasukawa, H., Katoh, A., & Imaizumi, T. (2005). HMG-CoA Reductase Inhibitor Protects Against In Vivo Arterial Thrombosis by Augmenting Platelet-Derived Nitric Oxide Release in Rats: *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 45(4), 375-381.
- Zhang, F.L., & Casey PJ. (1996). Protein Prenylation: Molecular Mechanisms and Functional Consequences. *Annu. Rev. Biochem.*, 65, 241-269.
- Zhang, Y., Gaetano, C. M., Williams, K. R., Bassell, G. J., & Mihailescu, M. R. (2014). FMRP interacts with G-quadruplex structures in the 3'-UTR of its dendritic target Shank1 mRNA. *RNA Biology*, 11(11), 1364-1374.
- Zimmerman, G. A., & Weyrich, A. S. (2008). Signal-Dependent Protein Synthesis by Activated Platelets: New Pathways to Altered Phenotype and Function. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(3), s17-s24.